



Escola de Camins
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports
UPC BARCELONATECH

“Evaluación de mezclas de subproductos de desinfección con espectrometría de masas usando análisis dirigidos y no dirigidos: identificación y priorización”

Trabajo realizado por:

María Fernanda Herrera Batista

Dirigido por:

Dra. Cristina Postigo Rebollo *(IDAEA-CSIC)*

Dra. María Jesús García Galán

Máster en:

Ingeniería Ambiental

Barcelona, 29 de junio de 2020

Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC) por permitir el uso de sus instalaciones y proveer recursos remotos para continuar con el desarrollo del presente trabajo una vez declarada la suspensión de las actividades presenciales.

A la Dra. Maria José Farré y al Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA) por el suministro de las muestras de agua objeto de estudio, así como el apoyo brindado en todas las situaciones y cuestionamientos realizados.

Igualmente, a la Dra. María Jesús García Galán por el soporte y disposición para resolver los inconvenientes que se presentaron al realizar el trabajo final de máster fuera de la Escola de Camins y la UPC.

Y finalmente, un especial agradecimiento a la Dra. Cristina Postigo Rebollo, quien, como tutora siempre mostró su apoyo y dedicación, orientándome y proporcionándome nuevos conocimientos en esta área de estudio, aclarando todas las dudas que se me presentaron, y contribuyendo en gran medida en la obtención de este informe.

Resumen

Los procesos de desinfección del agua, especialmente potable, constituyen en la actualidad uno de los avances en salud pública más significativos para la humanidad. El empleo de desinfectantes comunes, tales como cloro, cloraminas, dióxido de cloro y radiación UV, permite la eliminación de microorganismos patógenos presentes en el agua y causantes de millones de muertes en el pasado; estando en particular, la práctica de la cloración ampliamente extendida a nivel mundial. No obstante, el uso de estos químicos viene acompañado de una realidad: la formación de subproductos no deseados.

En este contexto, el presente estudio se enfoca en la caracterización de mezclas de subproductos de desinfección (DBPs, del inglés *disinfection by-products*) utilizando dos tipos de enfoques analíticos: dirigido y no dirigido. Esto se realizó en muestras de agua superficial, agua de entrada y salida (potable) de una estación de tratamiento de agua potable, y agua residual tras tratamiento secundario y terciario, sometidas a ensayos de potencial de formación de DBPs (PFDBPs) con cloro y cloramina y analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS).

En el enfoque dirigido, se cuantificaron los DBPs seleccionados: trihalometanos yodados (I-THMs), acetaldehídos trihalogenados (Tri-HALs), haloacetamidas (HACMs) y haloacetnitrilos (HANs). La sensibilidad de dicho método, permite obtener resultados en el rango de $\mu\text{g/L}$. Se encontraron I-THMs, Tri-HALs y HANs en todas las matrices. Las HACMs solo se detectaron en las muestras cloradas, a excepción del agua potable.

Por su parte, el enfoque no dirigido es abordado mediante dos procedimientos: en primer lugar, la elaboración de una “suspect list” de productos de transformación de contaminantes orgánicos emergentes formados durante los procesos de cloración, mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos publicados hasta la fecha, con el fin de aumentar el conocimiento de posibles DBPs a detectarse principalmente mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

En segundo lugar, se aplicó un flujo de trabajo para tratar los datos obtenidos mediante GC-HRMS e identificar los DBPs presentes en las muestras de agua del tratamiento terciario de los ensayos PFDBPs. El tratamiento de datos “no dirigido” permitió identificar 37 DBPs (51% no detectados con el enfoque dirigido), todos ellos en general a mayor concentración en las aguas cloradas que en las cloraminadas.

Finalmente, se realizó un ejercicio de priorización de los DBPs emergentes encontrados en las muestras, basado en la toxicidad relativa de los mismos y su abundancia en las muestras analizadas, exponiendo las clases Tri-HALs y HANs como aquellas de prioridad crítica para futuros estudios y monitorización en esta área.

Acrónimos

50%TDNA	Concentración 50% de tasa de migración de ADN fuera del núcleo
BAN	Bromoacetnitrilo
BCACM	Bromocloroacetamida
BCIM	Bromocloroyodometano
BDCACM	Bromodicloroacetamida
BDCAL	Bromodicloroacetaldehído
BDCAN	Bromodicloroacetnitrilo
BDIM	Bromodiyodometano
BIACM	Bromoyodoacetamida
CAN	Cloroacetnitrilo
CDIM	Clorodiyodometano
CI	Ionización química
CIACM	Cloroyodoacetamida
CNX	Cianuros
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DA	Dalton (unidad de masa atómica unificada)
DBACM	Dibromoacetamida
DBAN	Dibromoacetnitrilo
DBCACM	Dibromocloroacetamida
DBCAL	Dibromocloroacetaldehído
DBCAN	Dibromocloroacetnitrilo
DBIM	Dibromoyodometano
DBPs	Subproductos de desinfección
DCACM	Dicloroacetamida
DCAN	Dicloroacetnitrilo
DCIM	Dicloroyodometano
DIACM	Diyodoacetamida
EDAR	Estación depuradora de agua residual
ESI	Ionización por electrospray
ETAP	Estación de tratamiento de agua potable / Agua potable finalizada
GC-HRMS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HAAs	Ácidos haloacéticos

HACMs	Haloacetamidas
HANs	Haloacetanitrilos
HOCl	Ácido hipocloroso
HOCl/OCl ⁻	Cloro libre residual
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
IAN	Yodoacetanitrilo
ICRA	Institut Català de Recerca de l'Aigua
IDAEA	Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua
IE	Ionización electrónica
IR	Espectroscopía infrarroja
IS	Estándar interno
ISO	Organización Internacional de Estandarización
I-THMs	Trihalometanos yodados
LC ₅₀	Concentración del DBP que induce la viabilidad del 50% de las células en comparación con el control negativo
LC-HRMS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LLE	Extracción líquido-líquido
m/z	Relación masa-carga
MtBE	Metil ter-butil éter
NAs	N-nitrosaminas
N-DBP	Subproductos de desinfección nitrogenados
NH ₂ Cl	Cloramina
NHALs	Aldehídos no halogenados
NIST	National Institute of Standards and Technology
OCl ⁻	Ion hipoclorito
OMS	Organización Mundial de la Salud
P1	Vertido de agua regenerada proveniente del tratamiento terciario
P2	Agua superficial aguas arriba del punto de vertido
P3	Agua cruda en área de captación de ETAP
PFDBPs	Potencial de formación de DBPs

Rec	Recuperación
RSD	Desviación estándar relativa
TBACM	Tribromoacetamida
TBAL	Tribromoacetaldehído
TBAN	Tribromoacetonitrilo
TCACM	Tricloroacetamida
TCAL	Tricloroacetaldehído
TEF	Factor de toxicidad relativa
TEQ	Concentración de equivalentes tóxicos
TFM	Trabajo final de máster
THMs	Trihalometanos
TIM	Triyodometano o iodoformo
TN	Nitrógeno total
TOC	Carbono orgánico total
TON	Nitrógeno total oxidado
Tri-HALs	Acetaldehídos trihalogenados
TS	Agua de salida del tratamiento secundario
TT	Agua de salida de tratamiento terciario
US EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos

Índice

Agradecimientos.....	ii
Resumen	iii
Acrónimos.....	v
Índice.....	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xi
1 Introducción.....	12
2 Marco Teórico.....	14
2.1 Historia de la desinfección del agua potable	14
2.2 Subproductos de desinfección (DBPs).....	15
2.2.1 Descubrimiento de DBPs	16
2.2.2 Regulación de DBPs en agua potable	17
2.2.3 DBPs emergentes.....	19
2.3 Caracterización de mezclas de DBPs	21
2.3.1 Técnicas analíticas.....	21
2.3.2 Análisis dirigido y no dirigido	23
2.4 Priorización de DBPs.....	24
3 Objetivos y relevancia del estudio.....	26
4 Materiales y métodos.....	27
4.1 Muestras de agua.....	27
4.2 Análisis de DBPs	29
4.2.1 Ensayos de Potencial de Formación de DBPs (PFDBPs).....	29
4.2.2 Tratamiento de muestras.....	30
4.2.3 Análisis mediante GC-HRMS.....	30
4.3 Tratamiento de datos con un enfoque de análisis dirigido.....	31
4.3.1 DBPs seleccionados	31
4.3.2 Rendimiento del método	33
4.4 Tratamiento de datos con un enfoque de análisis no dirigido	35
4.4.1 Suspect list.....	35
4.4.2 Identificación de DBPs en datos de GC-HRMS usando bases de datos	37
4.5 Priorización de DBPs.....	38

5	Resultados y discusión	40
5.1	Análisis dirigido	40
5.1.1	<i>Rendimiento del método</i>	40
5.1.2	<i>PFDBPs</i>	42
5.2	Análisis no dirigido	49
5.2.1	<i>Elaboración de una lista de compuestos sospechosos “Suspect list”</i>	49
5.2.2	<i>Resultados del análisis no dirigido</i>	52
5.3	Ventajas e inconvenientes de análisis dirigido y no dirigido	53
5.4	Priorización de DBPs.....	54
6	Conclusiones	60
7	Referencias bibliográficas	63
8	Anexos	68

Índice de Figuras

Figura 1 Cronología de las primeras apariciones de clases de DBPs en la literatura.....	16
Figura 2 Esquema de localización de las cinco matrices de agua	27
Figura 3 Concentraciones de desinfectantes (cloro y cloramina) dosificados en matrices de agua	29
Figura 4. Información del compuesto Oxcarbazepina obtenida utilizando el programa ChemDraw.....	36
Figura 5 Flujo de trabajo utilizado para realizar análisis no dirigidos).....	38
Figura 6. PFDBPs en función de la matriz de agua investigada.....	43
Figura 7. Contribución (%) de las diferentes clases de DBPs a las concentraciones totales.....	44
Figura 8. Contribución (%) de los DBPs en función de los halógenos en su estructura.....	45
Figura 9. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz TS	46
Figura 10. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz TT	46
Figura 11. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz P1.....	47
Figura 12. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz T2	47
Figura 13. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz P3.....	47
Figura 14. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz ETAP.....	48
Figura 15. PFDBPs de las clases de DBPs, en función del proceso de desinfección ($\mu\text{g/L}$).....	48
Figura 16. Cuadro comparativo del análisis dirigido vs análisis no dirigido en la caracterización de DBPs	53
Figura 17. Potencia citotóxica de las matrices de agua expresada en concentración de equivalentes tóxicos (TEQ) y la contribución relativa (%) de las clases de DBPs y la presencia de yodo, bromo o cloro en dicha toxicidad, en función del proceso de desinfección.	57
Figura 18. Potencia genotóxica de las matrices de agua expresada en concentración de equivalentes tóxicos (TEQ) y la contribución relativa (%) de las clases de DBPs y la presencia de yodo, bromo o cloro en dicha toxicidad, según el proceso de desinfección.	58

Índice de Tablas

Tabla 1. Regulaciones y directrices establecidas para los DBPs ($\mu\text{g/L}$).....	8
Tabla 2. Caracterización físico-química de las aguas empleadas en los ensayos de potencial de formación de DBPs.....	28
Tabla 3. Lista de analitos seleccionados para ensayos de potencial de DBPs	32
Tabla 4. Resultados de parámetros calculados para determinación de rendimientos	40
Tabla 5. Información del compuesto oxcarbazepina presentada en la suspect list	51
Tabla 6. Concentración citotóxica (LC_{50}), genotóxica (50% TDNA) y toxicidad relativa (TEF_{CITO} y TEF_{GEN})	55
Tabla 7. Potencia tóxica de los DBPs según presencia de iones (yodo, bromo y cloro)	56

1 Introducción

El acceso al agua potable representa un derecho fundamental para todos los individuos, hecho que se constata en la iniciativa de los *Objetivos de Desarrollo Sostenible* impulsada por la Organización de las Naciones Unidas y aprobada por sus 193 estados miembros en el año 2015, en los que se establece garantizar que todo el mundo cuente con la disponibilidad de este recurso y su debido saneamiento, como una de sus metas (ONU, 2020); resultando la desinfección del agua un proceso clave para el cumplimiento de la misma.

Desde finales del siglo XIX, el uso del cloro en la potabilización del agua ha demostrado una gran eficacia en la eliminación de los microorganismos patógenos nocivos presentes en el agua (bacterias, virus, protozoos, gusanos, larvas) (Sawyer y McCarty, 1978), y, en consecuencia, en la disminución de enfermedades relacionadas con el agua que afligían a la humanidad: cólera, diarrea, fiebre tifoidea, entre otras (OMS, 2017).

Por ello, a lo largo del siglo XX, las prácticas de desinfección por cloración se generalizaron y aunque surgen desinfectantes alternativos como otros halógenos, ozono y radiación ultravioleta, el cloro continúa siendo ampliamente aceptado, ya que presenta ciertas ventajas frente a los anteriores: bajo coste, amplio espectro de actuación, fácil manipulación y aplicación, y lo más importante, poder desinfectante residual después de su aplicación.

No obstante, a partir de la década de 1970 inicia la preocupación entorno al uso de desinfectantes químicos para la desinfección del agua potable, al identificar que, además de reaccionar con los patógenos, alterando sus estructuras o desactivando algunas de sus funciones vitales, pueden reaccionar con la materia orgánica natural, contaminantes antropogénicos y otros componentes inorgánicos del agua (iones de bromuro y yoduro) y generar subproductos de desinfección (DBPs) que pueden llegar a tener riesgos sobre la salud humana y organismos acuáticos (Richardson y Postigo, 2015).

Desde la primera identificación del cloroformo y otros trihalometanos en el agua clorada en el año 1974, una línea de investigación se ha centrado en el descubrimiento de

nuevas clases de DBPs. Destacando la particularidad de aquellos encontrados recientemente, ya que en general, tal como describe Tang et al. (2020), tienden a ser más tóxicos que los DBPs de estudios anteriores.

Si bien en la actualidad se conocen más de 600 DBPs y las técnicas analíticas han avanzado en los últimos 40 años, más del 50% del material halogenado formado durante la cloración continúa siendo desconocido, así como el riesgo toxicológico que representan para la salud humana (OMS, 2017), porcentaje que es aún mayor para el ozono, cloraminas y dióxido de cloro (Richardson y Postigo, 2011).

Por lo tanto, es importante continuar con los esfuerzos realizados en la identificación de los DBPs presentes no solo en el agua potable, sino en las fuentes de agua en general, así como en los métodos analíticos utilizados.

En este sentido, la caracterización de mezclas de DBPs, identificando DBPs conocidos y no conocidos en matrices de agua reales sometida a ensayos en el laboratorio de potencial de formación de DBPs (PFDBPs) con cloro y cloraminas, mediante la ejecución de un análisis dirigido y otro, no dirigido; así como la elaboración de una *“suspect list”* a través de la revisión bibliográfica de DBPs formados de contaminantes orgánicos emergentes, son los principales objetos de este estudio.

2 Marco Teórico

2.1 Historia de la desinfección del agua potable

La desinfección de las aguas es una práctica que ha utilizado la población desde hace muchos años, ejemplo de esto son informes que indican que hace 2000 a.C. las aguas eran expuestas a la luz del sol y filtradas por carbón (Lenntech, 2020); y si bien, se continuaron desarrollando métodos en beneficio de la salud pública, como la implementación de filtros de arena, las prácticas de desinfección no fueron de uso popular hasta el siglo XX.

Este proceso, que actualmente es visto como clave en la potabilización del agua, no fue utilizado hasta 1850, cuando empezó a realizarse cloraciones en los sistemas de suministro, pero solo en situaciones de emergencia. Sin embargo, esta situación da un cambio gracias a investigaciones realizadas en diversas epidemias, como las ocurridas en Londres (cólera asiática, 1854), Suiza (fiebre tifoidea, 1872) y Alemania (cólera, 1892), en las que se concluyen que el agua es el vehículo de transmisión para dichas enfermedades y se confirma el efecto del cloro, en la disminución de las mismas.

A su vez, como menciona Sawyer y McCarty (1978), el crecimiento de cultivos puros de bacterias realizado por Robert Koch, fue una prueba contundente del rol del agua en estas enfermedades, propiciando que se volviera común el uso de hipoclorito en los sistemas de tratamiento de agua. Inglaterra utilizó su primer sistema de cloración continua en el año 1904, práctica que se popularizaría posteriormente en Europa. Para el caso particular de España, se ha registrado que la cloración llegó a la mayor parte de las ciudades en el año 1925 e igualmente con el uso de hipocloritos (García, 2020).

No obstante, aunque estos procesos de desinfección a base de cloración, y posteriormente de otros tipos de desinfectantes químicos, permitieron a las autoridades minimizar el riesgo de contagios de enfermedades relacionadas con el agua, surgió una problemática no deseada: la formación de DBPs y sus potenciales efectos adversos a la salud humana. Ante estos hallazgos, una serie de DBPs fueron regulados y al identificarse que los mismos se encontraban principalmente asociados con el cloro, otros tipos de desinfectantes químicos (cloraminas, ozono, dióxido de cloro, entre otros) comenzaron a emplearse.

Las cloraminas, de interés en este estudio, cuentan con su uso prohibido para tratamientos de desinfección de agua potable en países de la Unión Europea como Francia, Alemania e Italia; no obstante, en ciertos países como Reino Unido y España es una técnica permitida para la desinfección final del agua (Amy, 2007). Este desinfectante reduce la capacidad de formación de los DBPs actualmente regulados, pero favorece la formación de otras clases de DBPs, los llamados DBPs emergentes (DBPs con nitrógeno y con yodo en su estructura) (Le Roux et al., 2010).

2.2 Subproductos de desinfección (DBPs)

Los desinfectantes químicos son poderosos oxidantes que se han convertido en una parte fundamental de la producción de agua potable, al eliminar microorganismos patógenos. Sin embargo, su capacidad oxidante no es específica, y, por lo tanto, son capaces de reaccionar con otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua, tales como la materia orgánica natural, principalmente por hojas en descomposición y otros materiales vegetales, iones de bromuro y yoduro, produciendo así los llamados DBPs. La cantidad y naturaleza de los DBPs que se formen, dependerá de múltiples factores, como el tipo y dosis del desinfectante empleado, y de las condiciones en las que se realiza la desinfección (temperatura, pH, tiempo de contacto del desinfectante), así como de las características de las fuentes de agua usadas (Richardson et al., 2007).

Es importante señalar, que, dentro de la materia orgánica presente en el agua, se encuentran los contaminantes antropogénicos, sustancias de uso cotidiano como los fármacos, productos de cuidado personal, agentes antibacterianos, pesticidas, parabenos y tensoactivos, entre otros (Richardson y Postigo, 2011; Postigo y Richardson, 2014); que terminan en las aguas superficiales dada su escasa eliminación en las estaciones depuradoras de agua residual, y, por lo tanto, pueden ser también precursores de DBPs.

Este tipo de precursores son capaces de formar sus propias series de DBPs, siendo algunos de ellos tóxicos o estrogénicos, aun cuando sus compuestos padres no presenten dichas características (Richardson y Postigo, 2011).

2.2.1 Descubrimiento de DBPs

Los primeros DBPs identificados en el agua potable clorada fueron los trihalometanos (THMs), en un trabajo publicado en el año 1974 (Rook, 1974; Bellar et al., 1974). Posteriores investigaciones revelaron que los THMs causaban cáncer en animales de laboratorio, lo cual llevó a su regulación para agua potable en Estados Unidos y posteriormente, en otros países (US EPA, 1979).

A partir de este primer descubrimiento, nuevas clases de DBPs han sido identificadas. Tang et al. (2020) indican que 3570 publicaciones se han realizado en el área de DBPs de agua potable desde 1975 al 2018, destacando los THMs, ácidos haloacéticos (HAAs) y bromatos como los DBPs con mayor producción de artículos científicos.

En cuanto a su clasificación, según Richardson y Postigo (2011), podríamos distinguir dos grupos generales:

- **Halogenados:** Halometanos, haloácidos, haloaldehídos, halocetonas, halonitrilos, haloamidas, halofuranonas, halopirroles, haloquinonas, oxihaluros y halonitrometanos.
- **No Halogenados:** Nitrosaminas, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos

En la *Figura 1* podemos observar la evolución en los descubrimientos de diferentes clases de DBPs, siendo algunos de ellos de gran interés por sus altos niveles de toxicidad y predicción de propiedades carcinogénicas, como ocurre de manera general en los casos de DBPs yodados, bromados y nitrogenados (Tang et al., 2020).

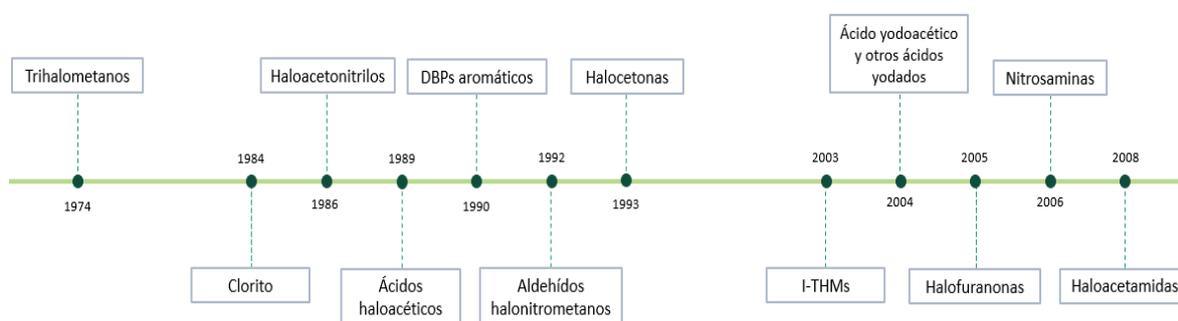


Figura 1. Cronología de las primeras apariciones de clases de DBPs en la literatura (Fuente: Elaboración propia, adaptada de Tang, et al., 2020)

Varios estudios han señalado que los seres vivos no se encuentran expuestos a los DBPs únicamente por ingestión, sino que existen otras rutas de exposición, como la inhalación y absorción dérmica, relevantes durante el baño, ducha y el nado (Richardson y Postigo, 2011). La exposición a DBPs, se ha asociado en estudios epidemiológicos a la aparición de efectos adversos a la salud humana, tales como cáncer de vejiga, y efectos negativos a nivel de desarrollo y reproducción (abortos espontáneos y defectos congénitos, entre otros) (Richardson et al., 2007; Cantor et al., 2010).

2.2.2 Regulación de DBPs en agua potable

Tras un poco más de 40 años de investigación, y a pesar de los más de 700 DBPs identificados en agua desinfectada (Thun et al., 2017), en la actualidad solo unos pocos (menos de dos docenas) se encuentran regulados o incluidos en directrices o valores guía que no son de obligado cumplimiento.

La *Tabla 1*, resume los límites establecidos en agua potable para DBPs como regulaciones impuestas por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (US EPA, 2020), la Unión Europea (UE, 2015) y Singapur (PUB, 2019); así como las directrices sugeridas por la US EPA (2015), la OMS (2018), Australia (NHRMC, 2018), Canadá (Health Canada, 2020), China (Ministry of Health People's Republic of China, 2006), Japón (MHLW, 2008) y Nueva Zelanda (Ministry of Health, 2019). Tal como se puede observar, los principales DBPs incluidos en estas regulaciones y directrices son:

- Trihalometanos (THMs)
- Ácido haloacéticos (HAAs)
- Haloacetosnitrilos (HANs)
- Trihaloacetaldehídos (Tri-HALs)
- Aldehídos no halogenados (NHALs)
- N-nitrosaminas (NAs)
- Oxihaluros

Lo cual concuerda con las clases de DBPs más investigadas y abundantes en agua potable, y en menor cantidad de casos, como en el de las nitrosaminas, con niveles de toxicidad elevados.

Tabla 1. Regulaciones y directrices establecidas para los DBPs (µg/L)

DBPs	US EPA ^{1,2}	OMS ³	Unión Europea ⁴	Australia ⁵	Canadá ⁶	China ⁷	Japón ⁸	Nueva Zelanda ⁹	Singapur ¹⁰
<i>THMs*</i>	80¹	-	100	250	100	-	100	-	-
Cloroformo	70¹	300	-	-	-	60	60	400	300
Bromodiclorometano	0¹	60	-	-	-	-	30	60	60
Clorodibromometano	60¹	100	-	-	-	-	-	150	100
Bromoformo	0¹	100	-	-	-	-	90	100	100
<i>HAA5**</i>	60¹	-	-	-	80	-	-	-	-
Ácido dicloroacético	0¹	50	-	100	-	-	30	50	50
Ácido tricloroacético	20¹	200	-	100	-	-	30	200	200
Ácido cloroacético	70¹	20	-	150	-	-	20	20	20
<i>HANs</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dibromoacetnitrilo	-	70	-	-	-	-	60	80	70
Dicloroacetnitrilo	-	20	-	-	-	-	10	20	20
Tricloroacetnitrilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tri-HALs</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tricloroacetaldehído	-	-	-	100	-	-	-	-	-
<i>NHALs</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Formaldehído	-	-	-	500	-	900	80	-	-
<i>NAs</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Nitrosodimetilamina	0.00069 ²	0.10	-	0.10	0.04	-	-	-	0.10
N-nitrosodietilamina	0.0008 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
N-nitrosopirrolidina	0.016 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
N-nitroso-di-n-butilamina	0.0063 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
N-nitrosodipropilamina	0.0050 ²	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CNX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloruro de cianógeno	-	-	-	80	-	-	10	400 (en CN total)	70
<i>Oxihaluros</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bromato	10¹	10	10	20	10	10	10	10	10
Clorato	-	700	-	-	1000	700	600	800	700
Clorito	1000¹	700	-	800	1000	700	600	800	700

Obs.: (1) Stage 2 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules, (2) National Recommended Water Quality Criteria - Human Health, (3) Guidelines for drinking-water quality 4th edition, (4) Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998, (5) Australian Drinking Water Guidelines 2011, (6) Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, (7) GB 5749-2006 Standards for Drinking Water Quality, (8) Drinking Water Quality Standards (DWQS 2015), (9) Drinking-water Standards for New Zealand 2005 (Revised 2018), (10) Environmental Public Health (Water Suitable for Drinking) (No.2) Regulations 2019.

Los valores regulados se diferencian de las directrices mediante el uso de formato de negrita al texto.

(*) El valor que se sitúa en THMs se refiere a la suma los cuatro THMs colocados en la tabla para esta clase

(**) El valor en HAA5 se refiere a la suma de los ácidos (cloro-, bromo-, dicloro-, dibromo- y tricloroacético), parámetro conocido como 'HAA5'.

Resulta evidente que existe un gran vacío regulatorio en torno a los DBPs, lo cual, según explica Richardson y Postigo (2016), puede asociarse de manera general a tres limitaciones:

- Falta de estudios y valores de toxicidad *in vivo* de los DBPs recientemente descubiertos.
- Insuficiencia en la cantidad de datos que permitan determinar la presencia de los DBPs en los distintos ámbitos territoriales, lo cual puede venir relacionado con la necesidad de utilizar métodos analíticos especializados para la evaluación de las diferentes clases de DBPs.
- Desconocimiento de más del 50% de los DBPs que se forman en los procesos de desinfección debido a las técnicas analíticas actuales.

2.2.3 DBPs emergentes

El término “DBPs emergentes” se refiere a aquellos subproductos identificados y no regulados. Entre ellos se incluyen las clases de halonitrometanos, iodo-trihalometanos, acetaldehídos trihalogenados, ácidos yodados, haloacetamidas, halofuranonas, haloacetoneitrilos, nitrosaminas y halobenzoquinonas. Cabe destacar que muchos de estos DBPs han demostrado ser más genotóxicos y/o citotóxicos que aquellos actualmente regulados en ensayos de toxicidad *in vitro* (Richardson et al., 2007).

- *Trihalometanos yodados (I-THMs)*

El primer DBP de yodo descubierto fue el dicloroyodometano, al cual se le denomina comúnmente como el “quinto trihalometano”, siendo otros subproductos de esta clase el bromocloroyodometano, clorodiyodometano y el yodoformo (Brass et al., 1977). Los I-THMs han sido detectados en agua potable clorada y cloraminada. En esta última por lo general se producen niveles más altos (Krasner et al., 2006).

Su formación requiere de una fuente de yodo en el cuerpo de agua a tratar, normalmente del ion yoduro, que está presente de forma natural en las aguas. Sin embargo, contaminantes antropogénicos con yodo, como el medio de contraste utilizado en pruebas radiológicas ‘yopamidol’, también pueden servir como fuente de yodo y promover la formación de los I-THMs (Duirk et al., 2011).

Distintas investigaciones han determinado que los I-THMs son citotóxicos y que el clorodiyodometano en particular, es altamente genotóxico en células de mamíferos (Richardson et al, 2008).

- *Acetaldehídos trihalogenados (Tri-HALs)*

Formados principalmente por desinfección con cloro y cloraminas, pero incrementados con prácticas de preozonización (Richardson y Postigo, 2011), los Tri-HALs cuentan con las especies conocidas: dicloroacetaldehído, tricloroacetaldehído, bromodicloroacetaldehído, dibromocloroacetaldehído y tribromoacetaldehído.

Investigaciones realizadas en Estados Unidos, como el Estudio Nacional de DBPs, revelaron que la clase 'haloaldehídos' era la tercera más abundante (después de los THMs y HAAs) de todos los DBPs estudiados; siendo el dicloroacetaldehído el detectado a mayores concentraciones (hasta 16 µg/L) (Weinberg et al., 2002).

A su vez, se ha conocido que muchos Tri-HALs son altamente citotóxicos y genotóxicos en células de mamífero, revelándose que el monocloroacetaldehído y el tricloroacetaldehído son mutagénicos en estudios *in vitro* (Richardson et al., 2007) y que este último junto con el tribromoacetaldehído son genotóxicos en células humanas (Liviak et al., 2010).

- *Haloacetanitrilos (HANs)*

Esta clase de DBPs se forma por la acción de desinfectantes comunes (cloro, cloraminas dióxido de cloro y ozono), encontrando trabajos que suelen presentar concentraciones elevadas en el agua potable finalizada al utilizar cloraminas (Richardson y Postigo., 2011), como algunos donde se documentan procesos de cloración favorecedores para la formación de este tipo de compuestos (Huang H et al., 2017).

Las especies más comunes dentro de esta clase de DBPs son el dicloro-, bromocloro-, dibromo-, y tricloroacetanitrilo; y como clase, representan los DBPs más genotóxicos estudiados en células de mamíferos y los terceros de mayor citotoxicidad, con valores similares a las haloamidas y halonitrometanos (Plewa et al., 2008a).

- *Haloacetamidas (HACMs)*

La bromoyodoacetamida fue la primera haloacetamida con yodo identificada en agua

potable en el año 2008, gracias a un estudio desarrollado en diferentes ciudades de Estados Unidos, en los que las fuentes de agua tenían niveles altos de bromuro y yoduro (Plewa et al., 2008b). Otros DBPs que conforman esta clase son yodoacetamida, dicloroacetamida, bromocloroacetamida, tribromodoacetamida, entre otros.

Las sustancias húmicas han sido señaladas como precursores potentes para la formación de la dicloroacetamida. Esto demuestra que las haloacetamidas se pueden formar mediante mecanismos independientes y no está limitada a la hidrólisis de los haloacetanitrilos, como se creía anteriormente (Huang et al., 2012).

2.3 Caracterización de mezclas de DBPs

2.3.1 Técnicas analíticas

Los experimentos realizados típicamente para evaluar la formación de DBPs e identificar nuevos DBPs suelen realizarse siguiendo uno de estos procedimientos (Richardson y Postigo, 2011):

- Reaccionando aguas naturales con desinfectantes, ya sea en condiciones reales en plantas de tratamientos de agua, o en condiciones controladas en estudios en plantas piloto o a escala de laboratorio.
- Aislado diferentes componentes de la materia orgánica presente en el agua (sustancias húmicas, fúlvicas, aminoácidos, material biológico, contaminantes antropogénicos), y haciéndolas reaccionar con desinfectantes en condiciones controladas de laboratorio.

Por su parte, el análisis de DBPs en las mezclas originadas en los experimentos anteriores representa un reto, ya que los DBPs al ser productos inherentes de reacciones, suelen ser desconocidos, y para muchos de ellos no se cuenta con patrones analíticos disponibles que ayuden a su identificación, por ende, siendo imposible de suponer con antelación que estructuras se formarán. Es por ello, que técnicas avanzadas selectivas y sensibles como la cromatografía (para separar los componentes de la muestra) y la espectrometría de masas de alta resolución (para una correcta identificación) tienen un papel fundamental en la caracterización de las mezclas de DBPs.

La *cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)* fue la primera herramienta utilizada para la identificación de DBPs en agua y en la actualidad, sigue siendo ampliamente utilizada en este campo, ya que muchos de estos compuestos son moléculas pequeñas volátiles y semivolátiles que se pueden volatilizar en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (Postigo y Richardson, 2014). Una ventaja del uso de GC-MS, es que los espectros de masas producidos mediante ionización por impacto electrónico son muy reproducibles, y por lo tanto se pueden utilizar librerías de espectros de masas para la identificación de DBPs. Sin embargo, cuando un DBP no está incluido en la librería, su identificación se tiene que realizar de forma manual mediante la interpretación del espectro o usando técnicas complementarias que generen información adicional acerca de la estructura del compuesto (GC-espectroscopía infrarroja (IR) o GC-MS con ionización química (CI)) (Richardson y Postigo, 2011).

Al contrario, la *cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)*, fue una técnica posterior, pero que ha recibido un gran auge al permitir el análisis directo de DBPs menos volátiles, de gran polaridad y alto peso molecular (Zwiener y Richardson, 2005), además de ofrecer generalmente mejor sensibilidad y límites de detección que la GC-MS (Postigo y Richardson, 2014). Conjuntamente, estudios han indicado que más del 50% del total de material halogenado en el agua potable puede ser >1000 Da en tamaño molecular, por lo que contar con técnicas que permitan analizar compuestos de alto peso molecular representa un gran avance en el cierre de la brecha de DBPs desconocidos (Khiari et al., 1997).

Los últimos avances en espectrometría de masas, han permitido que cada vez un mayor número de laboratorios tenga acceso a equipos de *alta resolución (HRMS)*, que permiten medir la masa exacta, y por lo tanto obtener la fórmula empírica de los iones producidos. Cuando se combinan analizadores de alta resolución (Orbitrap o Tiempo de Vuelo) con analizadores de tipo cuadrupolo, se puede obtener además información estructural que ayuda en la definición de la estructura molecular del compuesto (Postigo y Richardson, 2014).

2.3.2 *Análisis dirigido y no dirigido*

Independientemente del proceso de extracción y preparación de muestra, así como el equipo y técnica analítica a utilizar, existen dos tipos de enfoques que se utilizan para analizar los DBPs: dirigido y no dirigido.

○ *Análisis dirigido*

Corresponde al enfoque tradicional, utilizado principalmente con espectrometría de masas de baja resolución, y para el que se cuenta con los patrones analíticos de los compuestos a ser detectados en la muestra.

Al contar con dichos patrones, es posible la cuantificación de los compuestos objeto de análisis en la muestra, ya que se pueden construir curvas de calibrado. La identificación del compuesto se hace comparando el tiempo de retención y patrón de fragmentación o fragmentos característicos de los iones correspondientes a los compuestos seleccionados en la solución patrón y en la muestra.

○ *Análisis no dirigido*

A diferencia del enfoque previo, este análisis no dispone de patrones analíticos de los compuestos a detectar, por lo que la muestra debe ser analizada en modo “*full MS scan*” o barrido de iones, permitiendo además el análisis retrospectivo de las muestras.

Si bien existen enfoques no dirigidos para la identificación de DBPs con espectrometría de masas de baja resolución, la creciente popularidad de HRMS ha impulsado la aplicación de este tipo de enfoques para caracterizar mezclas de DBPs, aunque impliquen procesos que consumen una mayor cantidad de tiempo en cuanto al tratamiento de datos.

El proceso tradicional de enfoque no dirigido requería analizar los espectros de masa de los picos cromatográficos detectados en el barrido de iones y compararlos posteriormente de manera manual con librerías de espectros de masas. Esto, como se ha comentado anteriormente, es muy útil para tratar datos obtenidos mediante GC-MS. En la actualidad, existen librerías de masa exacta para usar con equipos GC-HRMS, que aumentan la fiabilidad en las estructuras identificadas.

No obstante, debido a la creciente aplicación de LC-MS para la determinación de nuevos DBPs, procesos alternativos han surgido para tratar los datos derivados de esta técnica:

- El uso de listas de compuestos sospechosos o “*suspect lists*” que incluyan todos los DBPs emergentes detectados a lo largo de los años para los diferentes procesos de desinfección.
- El desarrollo de flujos de trabajo con el uso de software comerciales o desarrollados por los usuarios con el fin de filtrar los datos de masas y priorizar los picos de interés en la mezcla, para los cuales se quiera focalizar los esfuerzos de identificación y su posterior monitoreo y control (Richardson et al, 2008c; Jeong et al., 2012).

2.4 Priorización de DBPs

La priorización de DBPs se refiere a la evaluación de los DBPs emergentes mediante una serie de criterios, que permitan identificar aquellas especies de mayor relevancia para ser abordadas en términos de establecimiento de límites umbrales, mejora de la supervisión de las instalaciones de tratamiento de agua potable y sistemas de distribución, así como en la reducción de su exposición (Mian et al., 2018).

Por lo tanto, esta evaluación representa una herramienta útil al identificar aquellas sustancias críticas en el contexto de seguridad del agua potable y con un mayor riesgo potencial para la salud humana y el ambiente; con el objetivo de proporcionarles un estado prioritario para futuros estudios y directrices.

Si bien en la actualidad no existe un método estándar para realizar este tipo de evaluaciones, diversos estudios resaltan la importancia de realizar enfoques de priorización multicriterio para obtener información que se ajuste a la realidad; siendo algunos de estos: el nivel de concentración del DBP en las aguas desinfectadas, la frecuencia con la que se encuentra, y la toxicidad del mismo (Bu et al, 2013; Burns et al., 2018; Mian et al., 2018).

En este sentido, se determinará la priorización de los DBPs emergentes analizados en las matrices investigadas, con la determinación de las concentraciones tóxicas efectivas, a nivel de toxicidad y genotoxicidad, de cada especie identificada en el análisis dirigido

.

3 Objetivos y relevancia del estudio

Dada la trascendencia que tienen los procesos de desinfección del agua en la eliminación de microorganismos patógenos, y la formación no deseada de subproductos que conlleva el uso de estos químicos, los objetivos principales del presente trabajo consiste en caracterizar las mezclas de DBPs que se forman durante la cloración y cloraminación en diferentes matrices de agua, mediante el uso de aproximaciones analíticas dirigidas y no dirigidas, así como priorizar los DBPs encontrados en el agua desinfectada en términos de su abundancia y su toxicidad.

Para ello, se tienen en consideración los siguientes objetivos específicos:

- Conocer el estado actual en relación a la formación, análisis y regulación de DBPs en agua potable.
- Realizar una revisión bibliográfica de artículos científicos enfocados en el estudio de productos de transformación de contaminantes orgánicos emergentes (fármacos, productos de higiene personal, pesticidas, entre otros) en procesos de cloración, con el fin de diseñar una “*suspect list*” para su uso en el tratamiento de datos derivados de LC-HRMS, con un enfoque no dirigido.
- Cuantificar los niveles de DBPs conocidos en matrices de agua reales sometidas a ensayos de PFDBPs (enfoque de análisis dirigido).
- Identificar DBPs mediante un enfoque no-dirigido en las muestras anteriormente mencionadas.
- Priorizar los DBPs en las mezclas investigadas en base a su abundancia y su toxicidad.

4 Materiales y métodos

4.1 Muestras de agua

Las muestras de agua utilizadas para la caracterización de DBPs se tomaron en el Área Metropolitana de Barcelona, durante el mes de junio de 2019. En total se tomaron cinco matrices de agua diferentes: agua cruda (*P3*) en el área de captación de una estación de tratamiento de agua potable (ETAP), agua de salida de dicha ETAP (*ETAP*), agua de salida del tratamiento secundario (*TS*) y del tratamiento terciario (*TT*) de una estación depuradora de agua residual (EDAR), vertido de una tubería de 16 km que transporta agua de la salida del TT a un área aguas arriba de la captación de la ETAP (*P1*) y agua superficial aguas arriba de dicho punto de vertido (*P2*) (ver Figura 2).

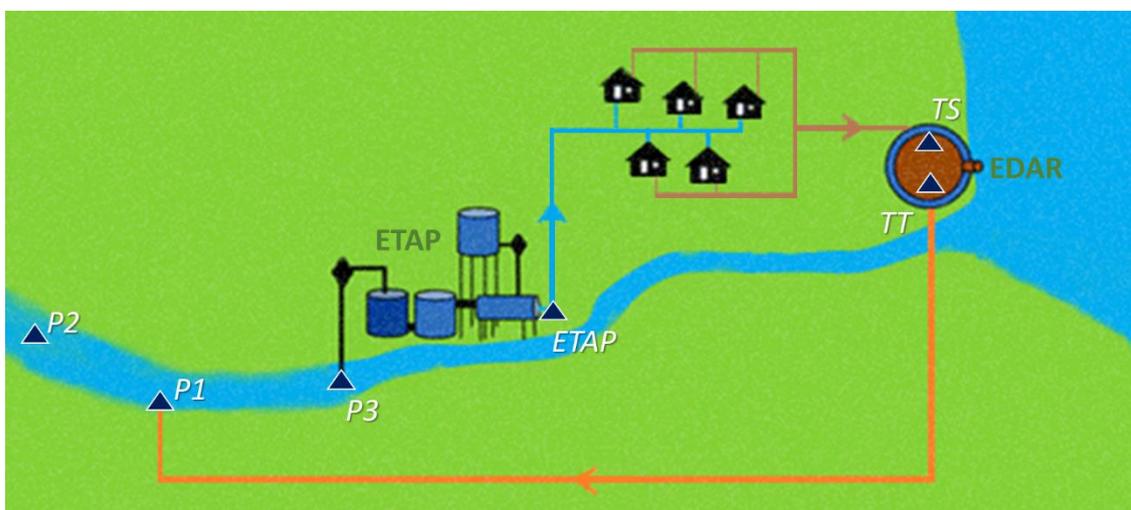


Figura 2. Esquema de localización de las cinco matrices de agua (Fuente. Elaboración propia, adaptada de Pochodylo, y Helbling, 2017).

Las aguas tomadas a la salida de la ETAP y de la EDAR se someten a diferentes trenes de tratamiento, resumidos a continuación:

- *ETAP*

El agua superficial captada en la planta se somete a un pretratamiento convencional de desarenado, pre-oxidación con dióxido de cloro, floculación, decantación y filtración de arena.

Después, una parte sigue por una línea de tratamiento convencional que consiste en ozonización y filtración por carbón granular activado, ultrafiltración, mientras que la otra parte se deriva a una línea de tratamiento avanzado que utiliza tecnología de

membranas (osmosis inversa, con procesos previos de radiación UV y filtración mediante cartuchos) y remineraliza el producto final. Los porcentajes de agua derivados a cada línea dependen de la calidad del agua de entrada a la planta.

Finalmente, el agua resultante de ambas líneas se mezcla y se clora, y se envía a un depósito para su estabilización (cloración homogénea) antes de ser impulsada a la red de distribución.

○ EDAR

El agua residual que entra a la planta se somete a un proceso de desbaste de gruesos, seguido del desarenado y desengrasado, y por último una decantación primaria, antes de pasar al tratamiento secundario.

- *Tratamiento secundario*: reactor biológico con eliminación de nutrientes mediante nitrificación y desnitrificación.
- *Tratamiento terciario*: tratamiento físico-químicos (floculación y decantación), microfiltración y desinfección con UV.

Tabla 2. Caracterización físico-química de las aguas empleadas en los ensayos de potencial de formación de DBPs.

Código	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	TOC (mg/L)	TN (mg/L)	Bromuro* (mg/L)
TS	7.3 \pm 0.3	2058 \pm 1	10.2 \pm 0.1	10.9 \pm 1.2	0.50 \pm 0.01
TT	7.0 \pm 0.4	2072 \pm 6	8.4 \pm 0.7	11.2 \pm 1.0	0.50 \pm 0.01
P1	7.4 \pm 0.2	2067 \pm 1	8.9 \pm 0.3	11.4 \pm 1.40	0.52 \pm 0.02
P2	8.2 \pm 0.1	1636 \pm 244	6.0 \pm 0.5	1.85 \pm 0.35	0.56 \pm 0.28
P3	8.1 \pm 0.0	1752 \pm 116	4.7 \pm 1.0	4.45 \pm 0.92	0.51 \pm 0.19
ETAP	7.7 \pm 0.1	871 \pm 115	3.7 \pm 0.1	2.15 \pm 0.07	<0.01

Obs.: P1 (vertido de agua regenerada), P2 (agua superficial), P3 (agua cruda), ETAP (agua de salida); TS (tratamiento secundario) y TT (tratamiento terciario)

() La cuantificación del ion bromuro presenta una interferencia de un pico adyacente, por lo que los valores pueden estar sobreestimados. Media \pm desviación estándar de n= 2*

La selección de diferentes matrices se realizó en base a evaluar el potencial de formación de DBPs (PFDBPs) de aguas con características diversas y los efectos que tienen los trenes de tratamiento en el potencial de las aguas de formar DBPs.

4.2 Análisis de DBPs

4.2.1 Ensayos de Potencial de Formación de DBPs (PFDBPs)

Una vez en el laboratorio, se realizaron ensayos de potencial de DBPs con cloro (HOCl/OCl^-) y cloramina (NH_2Cl), usando una variación del 'Método estándar de formación de trihalometanos No. 5710' descrito en la 23.^a edición del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (Baird y Bridgewater, 2017).

Las reacciones se llevaron a cabo con una dosis de desinfectante que después de 24 horas dejaran una concentración de desinfectante residual <2 ppm. Esta dosis, era diferente para cada muestra, debido a que depende de la diferente demanda de cloro de cada matriz (por ejemplo, mayor en el caso de las aguas de salida de secundario y terciario de la EDAR que en las aguas de río, debido a contenido en TOC) (ver Tabla 2 y Figura 3). Los ensayos de PFDBPs se realizaron durante 24 horas a 20°C y en la oscuridad.

La muestra de salida de la ETAP, dado que ya contenía cloro por el tratamiento de desinfección, no se dosificó con cloro o cloramina a diferencia de las demás matrices, y se dejó reaccionar con el cloro residual que tenía igualmente durante 24 horas a 20°C en la oscuridad.

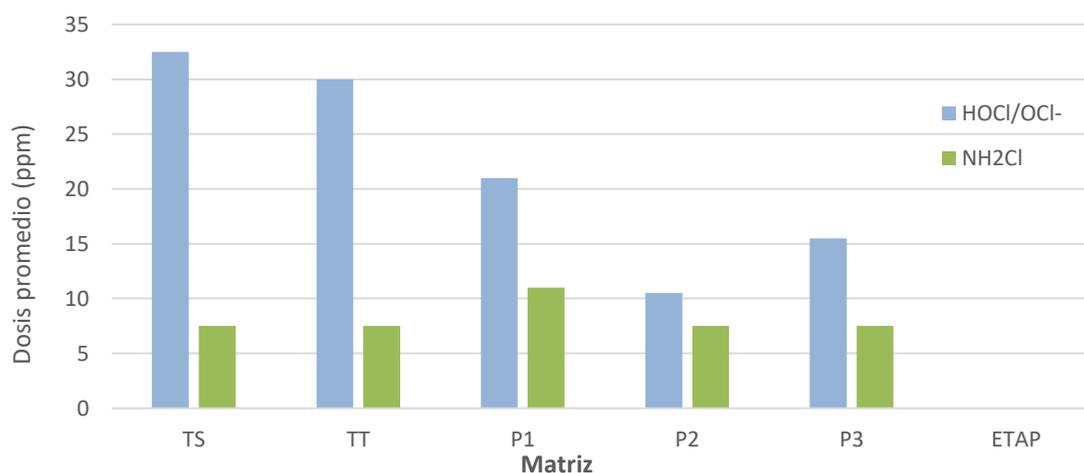


Figura 3. Concentraciones de desinfectantes (cloro y cloramina) dosificados en matrices de agua.

Tanto la toma de muestra como los ensayos de PFDBPs fueron realizados por el grupo de investigación de la Dra. Maria José Farré en los laboratorios del Institut Català de Recerca de l'Aigua (ICRA) en Girona, Cataluña.

4.2.2 Tratamiento de muestras

Previo al análisis por cromatografía y espectrometría de masas, las muestras se sometieron a un proceso de extracción líquido-líquido (LLE) para extraer y concentrar los DBPs del agua. Para ellos, se utilizó un protocolo adaptado del *“Procedimiento operativo estándar para el análisis de DBPs”* desarrollado por el *Advanced Water Management Centre* de la Universidad de Queensland, Australia (2012).

El método de extracción consistía en la acidificación de las muestras de agua (30 mL) con ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0.2 N) hasta un pH de 3.5 y la posterior adición de 3 mL del disolvente de extracción, metil ter-butil éter (MtBE) (con el patrón interno, 1-2 dibromopropano, utilizado en el proceso de cuantificación, a 100 $\mu\text{g/L}$) y 10 g de sulfato de sodio (Na_2SO) (para aumentar la fuerza iónica de la solución y contribuir a la separación de las dos fases). Justo después de haber añadido el sulfato de sodio, la muestra se agitó en vortex durante 1 minuto y se dejó reposar después durante 5 minutos, para dejar que se separasen bien las dos fases líquidas (MtBE y agua). Posteriormente, usando una pipeta Pasteur, se procedió a llenar dos viales con inserto (400 μL) por muestra, tomando el líquido de la capa superior, que correspondía al MtBE. Estos viales se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

4.2.3 Análisis mediante GC-HRMS

Un set de viales con los extractos obtenidos para las muestras objeto de investigación se analizó mediante GC-HRMS en el IDAEA-CSIC. El sistema analítico utilizado fue un cromatógrafo de gases *‘Trace 1310’* acoplado a un espectrómetro de masas *‘QExactive’* que tiene un analizador de masas de tipo *‘Orbitrap’*, ambos pertenecientes a la empresa de desarrollo *‘Thermo Fisher Scientific’*.

Los extractos de las muestras se introdujeron al *‘Trace 1310’*, mediante un inyector automático (modelo TriPlus RSH, *Thermo Fisher Scientific*). Un volumen de 1 μL se inyectó en modo splitless (a 50 mL/min durante 1 min) en una columna cromatográfica capilar. La separación cromatográfica de los analitos se consiguió usando una fase estacionaria de trifluoropropilmetilpolisiloxano (*RTX-200 MS*) de dimensiones 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, y 0.25 μm de grosor de película (Restek) y una fase móvil de helio a un flujo constante de 1 mL/min, usando el siguiente gradiente de

temperatura: 35 °C durante 3.5 minutos, seguido de un incremento lineal a razón de 7°C/min hasta llegar a una temperatura de 300°C, que se mantiene durante 10 minutos para eliminar rastros de sustancia retenidos en la columna y así, prepararla para la siguiente inyección. El tiempo de análisis total por muestra es de 51 min. Otras condiciones de análisis fueron: temperatura del inyector 200 °C, línea de transferencia entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas 280 °C y temperatura de la fuente de iones 230 °C. A efectos del análisis de masas, los compuestos que eluyen de la columna se ionizan con una fuente de ionización electrónica (EI) usando una energía de 70 eV.

El análisis de espectrometría de masas se hizo con una resolución de anchura a media altura (FWHM del inglés '*full width at half maximum*') de 60.000 a una relación de masa carga (m/z) de 200. La adquisición se realizó en el modo de barrido total de iones (*full scan*) en el rango de m/z 30-650 y con un valor automático de ganancia (AGC del inglés '*automated gain control*') de 1E+06. Dicha adquisición y el control del instrumento se realizó usando el programa *Thermo Xcalibur* versión de software 4.1.

4.3 Tratamiento de datos con un enfoque de análisis dirigido

El tratamiento de datos usando un enfoque de análisis dirigido permite realizar un análisis cuantitativo de compuestos seleccionados (a priori) para los que se tiene una curva de calibrado, y evaluar el rendimiento del método para ese análisis. Este tratamiento, asimismo, se llevó a cabo utilizando el programa *Thermo Xcalibur* v.4.1.

4.3.1 DBPs seleccionados

Los compuestos investigados pertenecen a las clases de DBPs: trihalometanos yodados (I-THMs), trihaloacetaldehídos (Tri-HALs), haloacetonitrilos (HANs) y haloacetamidas (HACMs), todos correspondientes a DBPs emergentes que como fuera visto en la sección 2.2.3, generan preocupación por su potencial tóxico. La *Tabla 3* muestra una lista de los compuestos analizados.

Tabla 3. Lista de analitos seleccionados para ensayos de potencial de DBPs

Clase	Analito	Abrev.	Fórmula	Iones característicos (<i>m/z</i>)
I-THMs	Dicloroyodometano	DCIM	Cl ₂ ICH	126.9039 , 82.9449, 174.8805
	Bromocloroyodometano	BCIM	BrClICH	128.8920 , 130.8894, 174.8804
	Dibromoyodometano	DBIM	Br ₂ ICH	172.8417 , 170.8438, 126.9039
	Clorodiyodometano	CDIM	ClI ₂ CH	174.8804 , 176.8774, 126.9038
	Bromodiyodometano	BDIM	BrI ₂ CH	218.8297 , 126.9038, 139.9117
	Triyodometano	TIM	I ₃ CH	266.8159 , 126.9039, 139.9117
Tri-HALs	Tricloroacetaldehído	TCAL	Cl ₃ C-CHO	81.9371 , 83.9342, 110.9399,
	Bromodicloroacetaldehído	BDCAL	BrCl ₂ C-CHO	82.9449 , 110.9399, 127.8842
	Dibromocloroacetaldehído	DBCAL	Br ₂ ClC-CHO	128.8920 , 126.8944, 130.8894
	Tribromoacetaldehído	TBAL	Br ₃ C-CHO	172.8417 , 174.8396, 92.9157
HANs	Cloroacetonitrilo	CAN	ClCH ₂ -CN	47.9761 , 49.9732, 74.9870
	Bromoacetonitrilo	BAN	BrCH ₂ -CN	120.9344 , 118.9365, 78.9178
	Yodoacetonitrilo	IAN	ICH ₂ -CN	166.9224 , 126.9038, 138.9039
	Dicloroacetonitrilo	DCAN	CHCl ₂ -CN	73.9791 , 81.9371, 83.9342
	Dibromoacetonitrilo	DBAN	CHBr ₂ -CN	119.9266 , 117.9286, 198.8448
	Bromodicloroacetonitrilo	BDCAN	CBrCl-CN	107.9401 , 109.9372, 153.8872
	Dibromocloroacetonitrilo	DBCAN	CBr ₂ Cl-CN	153.8872 , 151.8896, 197.8370
	Tribromoacetonitrilo	TBAN	CBr ₃ -CN	197.8369 , 199.8349, 116.9208
HACMs	Dibromoacetamida	DBACM	Br ₂ CH- CONH ₂	44.0131 , 173.8496, 121.9185
	Dicloroacetamida	DCACM	Cl ₂ CH-CONH ₂	44.0131 , 82.9449, 84.9420
	Bromocloroacetamida	BCACM	BrClCH- CONH ₂	44.0131 , 128.8923, 91.9256
	Cloroyodoacetamida	CIACM	ClICH-CONH ₂	126.9039 , 175.8883, 44.0131
	Bromoyodoacetamida	BIACM	BrICH-CONH ₂	137.0228 , 107.9443, 218.9570.
	Diyodoacetamida	DIACM	I ₂ CH-CONH ₂	137.0228 , 126.9039, 183.9253
	Tricloroacetamida	TCACM	Cl ₃ C-CONH ₂	44.0131 , 81.9371, 97.9558
	Bromodicloroacetamida	BDCACM	BrCl ₂ C- CONH ₂	44.0131 , 81.9371, 125.8866
	Dibromocloroacetamida	DBCACM	ClBr ₂ C- CONH ₂	44.0131 , 127.8842, 206.8026
	Tribromoacetamida	TBACM	Br ₃ C-CONH ₂	44.0131 , 171.8339, 80.9157

Obs.: El ion utilizado para la cuantificación se ha resaltado en negrita.

La identificación positiva de estos compuestos en las muestras se hizo en base a dos criterios, siguiendo las recomendaciones de la Guía SANTE/12682/2019 (criterios para el control de calidad y la validación de metodologías para el análisis de pesticidas en alimentos):

- El *tiempo de retención* del DBP en la muestra era el mismo que el observado en la solución patrón (con una tolerancia de ± 0.1 min). En casos excepcionales, mayores desviaciones se han aceptado siempre y cuando el patrón interno se hubiera visto afectado de la misma forma (por efectos de la matriz).
- La presencia de al menos dos *iones característicos* (de diferentes partes de la molécula, es decir no pertenecientes al mismo clúster isotópico) (identificados con una resolución de masa ≤ 5 ppm) que presenten una relación señal ruido (S/N) ≥ 3 , y cuya señal cromatográfica se superponga completamente (*Tabla 3*).

4.3.2 Rendimiento del método

El método utilizado fue verificado a través de la evaluación de los parámetros: linealidad, sensibilidad, exactitud (recuperación y veracidad de la medida), y precisión (reproducibilidad), para comprobar que es adecuado para el propósito previsto.

Dada la ausencia de normativa en cuanto a la validación de métodos para la determinación de contaminantes en muestras ambientales, se utilizó como guía para el proceso de validación el “Documento guía para procedimientos analíticos de control de calidad y validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos No. SANTE/12682/2019” de la Comisión Europea (2020).

- *Linealidad*

La linealidad se evaluó analizando diferentes soluciones de calibrado, realizadas al fortificar agua de grado HPLC con los patrones de DBPs listados en la *Tabla 3*, a diferentes concentraciones (rango de 0,05 a 100 $\mu\text{g/L}$), siendo procesadas y extraídas en las mismas condiciones que las muestras.

Las *rectas de calibrado* se obtuvieron con el método de patrón interno, considerando la relación entre las señales del analito y el estándar interno (IS) en las diferentes

soluciones de calibrado; correspondiendo así, cada recta a un modelo de regresión lineal ajustado mediante el método de mínimos cuadrados ponderados ($1/x$).

El *rango lineal del método para cada analito* incluye aquellas concentraciones en las que la respuesta de las soluciones de calibrado era ajustada al modelo construido, es decir desviaciones del valor teórico menores a un 25%. De hecho, solo aquellas soluciones de calibrado incluidas en el rango lineal del método, fueron utilizadas para calcular el modelo de regresión lineal y su coeficiente de determinación (R^2), utilizado en la cuantificación de cada compuesto.

- *Sensibilidad*

La sensibilidad se obtiene examinando los puntos más bajos de la recta de calibrado y la señal del analito en las muestras. Para ello se determina el *límite de detección (LOD)* y el *límite de cuantificación (LOQ)* mediante la evaluación visual del pico cromatográfico. El LOD y el LOQ corresponden con las concentraciones para cada analito, en las que el correspondiente pico cromatográfico presenta una razón de señal/ruido (S/N, por sus siglas en inglés) de 3 y de 10, respectivamente.

- *Exactitud (recuperación)*

La recuperación del analito en el método se evaluó fortificando muestras de agua de grado HPLC con los patrones de DBPs objeto de estudio, a una determinada concentración (10 $\mu\text{g/L}$), procesándose bajo el mismo método de extracción LLE y realizando cuatro repeticiones ($n = 4$).

Se procedió a comparar la señal (área del pico cromatográfico) de analito obtenida en estas muestras y en una solución patrón a una concentración equivalente (100 $\mu\text{g/L}$); siendo recuperaciones medias aceptables aquellas dentro del rango 70 – 120% (Comisión Europea, 2020).

- *Exactitud (veracidad)*

Definido según la ISO 354 (1993) como la cercanía del acuerdo entre el valor medio obtenido de un gran conjunto de resultados de la prueba y un valor de referencia aceptado o una muestra fortificada cuando no se cuenta con este último. En nuestro caso expresa la cercanía del valor medido al valor teórico y se evaluó en agua de grado

HPLC fortificada con los compuestos objeto de estudio a una concentración de 10 µg/L. La veracidad se evalúa en términos del bias o sesgo, siendo aceptable cuando los valores se encuentran dentro del rango 70 – 120% (Comisión Europea, 2020).

- *Precisión (reproducibilidad)*

La precisión se refiere a la cercanía del acuerdo entre los resultados analíticos independientes obtenidos aplicando el mismo procedimiento experimental. Esto se estudió en agua de grado HPLC fortificada con los analitos objeto de estudio a una concentración de 10 µg/L. La medida de la precisión o reproducibilidad se representa mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones para las cuatro repeticiones, siendo aceptables aquellas que presentan un valor menor o igual a 20% (Comisión Europea, 2020).

4.4 Tratamiento de datos con un enfoque de análisis no dirigido

El tratamiento de datos usando un enfoque de análisis no dirigido permite realizar un análisis cualitativo de todos los compuestos presentes en la mezcla. La principal diferencia con el enfoque dirigido es que, en este caso, no se dispone de patrones analíticos, y, por lo tanto, la identificación de los compuestos se tiene que realizar usando bien, listas de compuestos que se piensa pueden estar en la mezcla o bases de datos.

El presente tratamiento de datos de GC-HRMS con un enfoque no dirigido se llevó a cabo utilizando el programa *'TraceFinder'* versión de software 4.1 (Thermo Fisher Scientific). Dentro de las tareas del tratamiento de datos no dirigido, también se trabajó en la elaboración de una lista de compuestos “sospechosos” para su futura aplicación en el tratamiento de datos LC-HRMS con un enfoque no dirigido.

4.4.1 *Suspect list*

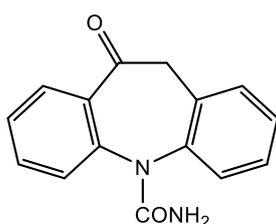
Dada la inexistencia hasta la fecha de listas específicas de compuestos para descubrir DBPs en aguas cloradas en datos derivados de espectrometría de masas, se trabajó principalmente durante el estado de alarma y periodo de confinamiento, en la elaboración una lista de compuestos sospechosos o “*suspect list*” de DBPs que se forman

durante la cloración de contaminantes orgánicos antropogénicos (fármacos, productos de cuidado personal, pesticidas, filtros solares, conservantes, entre otros) que están presentes en las fuentes de agua potable.

Para ello, se realizó una búsqueda de trabajos publicados en la literatura revisada por pares en la base de datos *Scopus* (www.scopus.com), usando los términos “Chlorination transformation products” en los campos “título del artículo, resumen y palabras clave”. Esta búsqueda generaba 546 resultados, sin embargo, solo aquellos trabajos que cumplieran con el objeto de estudio y describieran la vía de degradación de los compuestos con la representación gráfica de cada estructura, fragmentos de los iones mayoritarios, así como la técnica analítica empleada fueron seleccionados.

Una vez seleccionados los artículos de interés, se utilizó el programa *ChemDraw*, para obtener información acerca de la masa exacta y otros identificadores únicos como el SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification), el InChI (International chemical identifier) o el InChIkey (derivado del InChI) de los compuestos originales y de sus subproductos de cloración, a través de las estructuras químicas presentadas en los artículos; mostrando un ejemplo del uso del programa en la *Figura 4*.

OXCARBAZEPINE



10-oxo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*b,f*]azepine-5-carboxamide

Chemical Formula: C₁₅H₁₂N₂O₂

Exact Mass: 252.0899

Molecular Weight: 252.2730

m/z: 252.0899 (100.0%), 253.0932 (16.2%), 254.0966 (1.2%)

Elemental Analysis: C, 71.42; H, 4.79; N, 11.10; O, 12.68

O=C1CC2=C(C=CC=C2)N(C(N)=O)C3=C1C=CC=C3 CTRLABGOLIVAIY-UHFFFAOYSA-N

InChI=1S/C15H12N2O2/c16-15(19)17-12-7-3-1-5-10(12)9-14(18)11-6-2-4-8-13(11)17/h1-8H,9H2,(H2,16,19)

Figura 4. Información del compuesto Oxcarbazepina obtenida utilizando el programa ChemDraw.

A parte de la información anteriormente mencionada, la lista se completó con el nombre sistemático, la fórmula empírica del compuesto, el número de registro CAS y ChemSpider ID (CSID) (estos dos últimos obtenidos introduciendo el SMILES en la base de datos *ChemSpider* [www.chemspider.com]), así como información acerca de técnica

y método de ionización utilizado para su identificación, iones fragmentos característicos observados, y la referencia al trabajo del que se extrajo esta información.

4.4.2 Identificación de DBPs en datos de GC-HRMS usando bases de datos

Dado el tiempo que requiere el análisis de este tipo de datos, esta tarea se llevó a cabo únicamente en las muestras del PFDBPs en presencia de cloro y de cloramina realizadas con el agua que sale del tratamiento terciario (TT).

Para ello, se procesaron de forma simultánea con el programa *TraceFinder* (Thermo Fisher Scientific) las muestras disponibles de TT, una solución que contenía los patrones analíticos de DBPs incluidos en el enfoque dirigido y unas muestras control o blancos (agua Milli-Q sometida al PFDBPs con cloro y procesada y analizada igual que las muestras).

El programa *TraceFinder* realiza de forma automática una deconvolución de las características m/z adquiridas durante el análisis y la alineación de los picos cromatográficos obtenidos para cada una de ellas. Para ello se establecieron unos valores de tolerancia de masa de 5 ppm y de desplazamiento de tiempo de retención de 0.5 min. Una vez realizado esto, se agrupan las diferentes características m/z asignándolas a un mismo pico. Para la anotación de los distintos picos (compuestos) identificados, el software compara cada espectro de masas asociado con los contenidos de diferentes librerías de espectros de masas disponibles en el programa, entre ellos la NIST. También se podrían usar en este caso listas de compuestos, pero la diseñada en el marco de este TFM esta principalmente dirigida al análisis de datos obtenidos mediante LC-HRMS.

La lista de candidatos obtenida, se muestra en la forma de un mapa de calor (*heat map*) que ayuda a identificar los picos de interés, en nuestro caso los DBPs presentes en las muestras (aquellos picos que no están presentes en los blancos).

Aunque todo el proceso anterior es automático, la verificación de la identidad de los compuestos identificados se ha de realizar de forma manual, de tal forma que se tiene que confirmar que el emparejamiento de los espectros de masas (muestra vs base de

datos) sugerido por el software es correcto o no; prestando especial atención a la aparición de DBPs que no fueran contemplados en el análisis dirigido.

Para una mayor comprensión del procedimiento utilizado, la *Figura 5* nos muestra el flujo de trabajo empleado para realizar las identificaciones de DBPs en las mezclas mediante un análisis no dirigido.

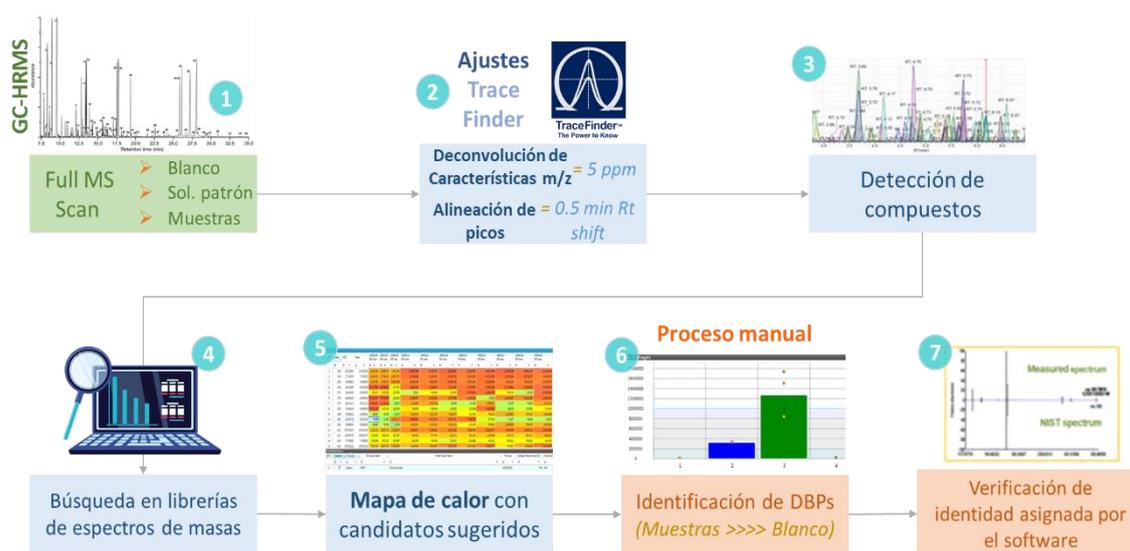


Figura 5. Flujo de trabajo utilizado para realizar análisis no dirigidos (Fuente. Elaboración propia).

4.5 Priorización de DBPs

La priorización de DBPs se efectuó calculando la concentración de equivalentes tóxicos (TEQ, del inglés *toxic equivalent quotients*) para cada DBP estudiado en el enfoque dirigido, de acuerdo a sus valores de toxicidad y la concentración detectada en la mezcla.

La toxicidad de estos compuestos se evaluó en base a los valores obtenidos de citotoxicidad y genotoxicidad en ensayos *in vitro* realizados con células de mamífero (células de ovario de hámster) (Wagner y Plewa, 2017).

El TEQ se obtiene, tal como se muestra en la *Ecuación 1*, a partir de la concentración del DBP en la mezcla (C_i) y su toxicidad relativa (TEF, del inglés '*toxic equivalency factor*').

$$TEQ = \sum [C_i] \times TEF_i \quad (Ec. 1)$$

Para determinar el TEF_i , se ha tomado como compuesto de referencia el ácido yodoacético, ya que es uno de los DBPs más genotóxicos y citotóxicos evaluados con el

ensayo anteriormente mencionado (concentración citotóxica efectiva de 2.95E-06 y genotóxica de 8.70E-06), utilizando la *Ecuación 2*.

$$TEF_i = \frac{EC_{ref}}{EC_i} \quad (Ec. 2)$$

Donde EC_{ref} es la concentración tóxica efectiva del compuesto de referencia y EC_i es la concentración tóxica efectiva del DBP de estudio.

Debido a que analizamos la toxicidad desde un punto de vista citotóxico y genotóxico, se calcularon dos TEF_i , siendo la EC_{ref} para los ensayos crónicos de citotoxicidad, la concentración del DBP que induce la viabilidad del 50% de las células en comparación con el control negativo (LC_{50}); mientras que en el caso de los ensayos agudos de genotoxicidad, se corresponde con la concentración que provoca un 50% de tasa de migración de ADN fuera del núcleo (50% TDNA).

5 Resultados y discusión

5.1 Análisis dirigido

5.1.1 Rendimiento del método

La verificación realizada al rendimiento del método y su capacidad de dar resultados acordes con el propósito del presente estudio, puede observarse en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Resultados de parámetros calculados para determinación de rendimientos

Clase	Analito	Linealidad		Sensibilidad		Exactitud y precisión		
		Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	R ²	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Rec* (%)	RSD** (%)	Bias (%)
I-THMs	DCIM	0.05 - 100	0.9982	0.05	0.15	87	3.5	92.4
	BCIM	0.05 - 100	0.9966	0.05	0.15	93.1	3.4	96.2
	DBIM	0.05 - 100	0.9932	0.05	0.15	97.7	5.5	82.1
	CDIM	0.05 - 25	0.9900	0.05	0.10	100	3.1	98.8
	BDIM	0.10 - 25	0.9927	0.10	0.25	98.1	3.0	100.1
	TIM	0.10 - 25	0.9941	0.10	0.50	110.1	4.6	110.1
Tri-HALs	TCAL	0.05 - 100	0.9985	0.07	0.15	87.8	2.6	98.1
	BDCAL	0.10 - 100	0.9968	0.25	0.50	91.9	2.6	81.9
	DBCAL	0.50 - 25	0.9942	0.25	0.50	102.8	5.1	99.8
	TBAL	1.0 - 25	0.9794	0.70	1.50	105.6	5.4	87.2
HANs	CAN	0.10 - 100	0.9983	0.10	0.25	76.4	4.9	97.9
	BAN	0.10 - 100	0.9972	0.10	0.25	89.2	4.6	82.8
	IAN	0.05 - 25	0.9918	0.05	0.15	89.8	3.1	96.6
	DCAN	0.05 - 100	0.9986	0.05	0.10	91.4	2.9	100.4
	DBAN	0.10 - 25	0.9970	0.10	0.25	104.8	3.6	96.4
	BDCAN	2.5 - 100	0.9860	2.5	4.0	85.8	3.3	87.0
	DBCAN	5.0 - 100	0.9960	5.0	10	99.4	0.8	124.5
	TBAN	10 - 100	0.9839	10	20	100	0.2	108.4
HACMs	DBACM	10 - 100	0.9940	10	25	92.1	10.4	113.7
	DCACM	10 - 100	0.9915	10	25	46.9	4.5	115.9
	BCACM	5.0 - 100	0.9949	10	25	70	7.6	103.5
	CIACM	5.0 - 100	0.9967	5.0	10	99.9	9.2	99.8
	BIACM	5.0 - 100	0.9970	10	20	110.2	8.4	99.6
	DIACM	5.0 - 100	0.9953	5.0	10	126.1	15.2	108.6
	TCACM	1.0 - 100	0.9946	1.0	2.0	98.6	7.1	84.2
	BDCACM	5.0 - 100	0.9921	5.0	10	105.1	6.5	93.1
	DBCACM	10 - 100	0.9910	7.5	15	107.1	5.4	114.2
	TBACM	10 - 100	0.9906	10	25	114.9	9.0	116.4
IS	1,2-DBP	na	na	na	na	95.1	4.1	na

Obs.: *Rec (Recuperación), **RSD (Desviación estándar relativa), na (No aplicable)

○ *Linealidad*

En todos los casos, se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) por encima de 0.97, siendo en un 89% de los casos, mayor de 0.99. Por su parte, el rango lineal del método, evaluado en agua pura, se expande desde el límite de cuantificación de cada analito en esta matriz hasta 100 $\mu\text{g/L}$ en la mayoría de los casos, con excepción de algunos I-THMs (CDIM, BDIM, TIM), Tri-HALs (DBCAL and TBAL) and HANs (IAN, DCAN y DBAN), para los que la linealidad del método llega solo hasta 25 $\mu\text{g/L}$.

○ *Sensibilidad*

Al analizar la sensibilidad del método por clase de DBPs, podemos observar niveles de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) por debajo de 1 $\mu\text{g/L}$ para los I-THMs, Tri-HALs y gran parte de las especies HANs.

En cambio, para las HACMs, a excepción del TCACM, se observa una sensibilidad baja al requerirse mayores concentraciones para el analito ($\geq 5 \mu\text{g/L}$) para que sea si quiera detectado. Dado que las recuperaciones del método son satisfactorias (ver exactitud), la baja sensibilidad reportada se debe a que la técnica instrumental empleada o las condiciones analíticas empleadas, no son las ideales para estos compuestos. En este respecto, decir que en metodologías multi-analito, se debe adquirir un compromiso en las condiciones analíticas para la determinación simultánea de compuestos de diferentes clases químicas, y, por lo tanto, con diferentes propiedades físico-químicas.

En cuanto a la sensibilidad, indicar que el hecho de que, en agua pura, los LOQs (el límite inferior del rango lineal) sean en general más bajos que en la matriz de muestras reales, se puede atribuir a la presencia de otros componentes en las muestras que interfieren en el análisis, compitiendo en el proceso de ionización y por lo tanto resultando en LOQs más elevados en estas últimas.

○ *Recuperación*

Los valores de recuperación (Rec) de la *Tabla 4*, son en general satisfactorios, encontrándose para la mayoría de los compuestos entre 70 y 120 % según lo establecido en la sección 4.3.3. No obstante, observamos que dos especies de las HACMs, DCACM (46.9%) y DIACM (126.1%), no cumplen con dicha condición, por lo que la exactitud de

los valores cuantificados podría verse comprometida (infravalorados en el caso de la DCACM o sobreestimados en el caso de la DIACM).

En casos como este, el “*Documento guía para procedimientos analíticos de control de calidad y validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos No. SANTE/12682/2019*”, indica que las tasas de recuperación que se encuentren fuera del rango pueden aceptarse de ser consistentes (ver valores de precisión) y no mostrar valores inferiores del 30%, ni superiores al 140%.

- *Precisión*

La reproducibilidad (RSD) muestra valores menores del 20% en todos los casos, cumpliendo con lo establecido en la sección 4.3.3. El peor resultado en términos de variabilidad se observa para la DIACM con un 15.2% (DBP con una recuperación ligeramente por encima del 120%), aunque sigue estando dentro del rango de precisión aceptado.

- *Veracidad*

Todos los datos calculados para el parámetro de veracidad (bias) se encontraron en el rango aceptable (70-120%), encontrando solo un valor por encima del 120% pero muy próximo a al mismo.

5.1.2 *PFDBPs*

Los datos obtenidos después de analizar con GC-HRMS las muestras investigadas de acuerdo a lo descrito en la sección 4.2 fueron procesados con un enfoque dirigido usando el programa *Thermo Xcalibur* para cuantificar los DBPs listados en la *Tabla 3*.

A continuación, analizaremos los resultados obtenidos acorde a las matrices investigadas en presencia de cloro y de cloramina, y a las cuatro clases de DBPs emergentes analizadas. A efectos de representación y de cálculos de medias, los valores que se encontraron por debajo del LOQ han sido sustituidos por la mitad del correspondiente valor de LOQ (LOQ/2).

Las concentraciones individuales cuantificadas para cada compuesto en cada una de las muestras analizadas se muestran en el Anexo B.

○ *PFDBPs en las diferentes matrices de agua investigadas*

El PFDBPs presentó variaciones significativas de acorde a la muestra de agua investigada, no obstante, como se puede observar en la *Figura 6*, en cualquiera de dichas matrices, el PFDBPs fue mucho menor en presencia de cloramina que de cloro.

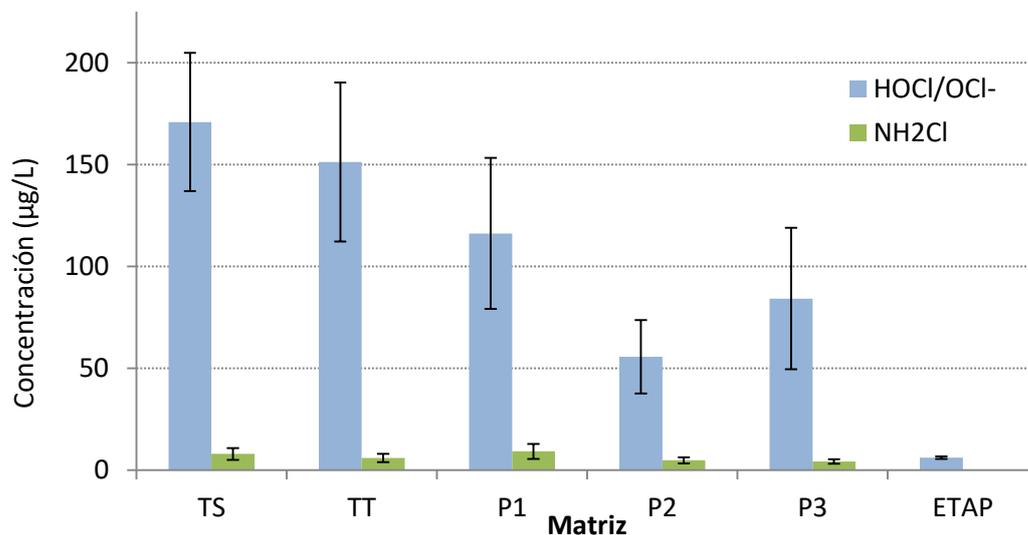


Figura 6. PFDBPs en función de la matriz de agua investigada (Nota: En ETAP solo se realizó ensayo de PFDBP con cloro, usando el cloro libre residual de esta agua).

En presencia de cloro, la *matriz TS*, correspondiente al agua de salida de un tratamiento secundario de una EDAR, presenta el mayor PFDBPs seleccionados entre todas las matrices estudiadas (*Figura 6*). Esto era previsible debido a que esta matriz también presenta los mayores niveles de TOC (10.2 mg/L) (*Tabla 2*). Asimismo, a pesar del tratamiento terciario al que es sometida esta matriz (ver sección 4.1), ni el TOC, ni el PFDBPs se ve reducido de forma drástica en el próximo punto de muestreo (*matriz TT*), presentando una reducción de un 18% en el caso del TOC y un 11% en el caso de los DBPs.

El agua del TT que sale de la tubería de 16 km (*P1*) revela un PFDBPs menor que la que sale de la EDAR, y aunque parece que su vertido aumenta el PFDBPs del agua del río (*P2* vs *P3*), el tratamiento del agua de la *ETAP* reduce el PFDBPs estudiado en el agua finalizada a niveles mínimos (un 93% respecto al agua de entrada P3).

Por consiguiente, los potenciales de formación observados en cada matriz están en línea con el TOC manifestado en la *Tabla 2* para cada matriz (TS > TT > P1 > P3 > P2 > ETAP).

En cuando al PFDBPs en presencia de cloramina, aunque las reducciones absolutas no son tan notables como en el caso del cloro, el vertido del agua del tratamiento terciario (P1) al río no parece afectar al PF de los DBPs estudiados del agua del río (P2 y P3 presentan niveles totales de DBPs de 5 µg/L), a pesar de que el vertido del agua del terciario presenta un PFDBPs de casi el doble que éstas.

Con respecto a las clases químicas estudiadas que más contribuyen a las concentraciones de DBPs totales observadas en cada matriz, tanto en presencia de cloro como de cloramina, predominan los acetaldehídos trihalogenados seguidos de los haloacetnitrilos (*Figura 7*). Las principales diferencias se dan en la preferente formación de haloacetamidas (HACMs) en presencia de cloro y de iodo-THMs (I-THMS) en presencia de cloramina.

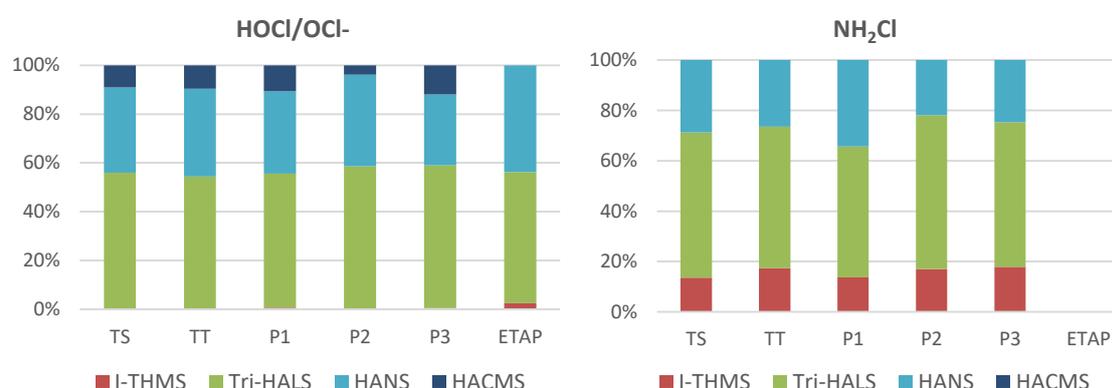


Figura 7. Contribución (%) de las diferentes clases de DBPs a las concentraciones totales.

○ *Potencial de formación de las diferentes especies de DBPs*

La formación de DBPs que contienen yodo en su estructura, fue menor que la de los que contienen bromo y cloro en todos los casos, excepto en P2 y P3 donde los iodo-DBPs > cloro-DBPs (*Figura 8*), lo que evidencia la ausencia de una fuente de yodo relevante en las matrices estudiadas.

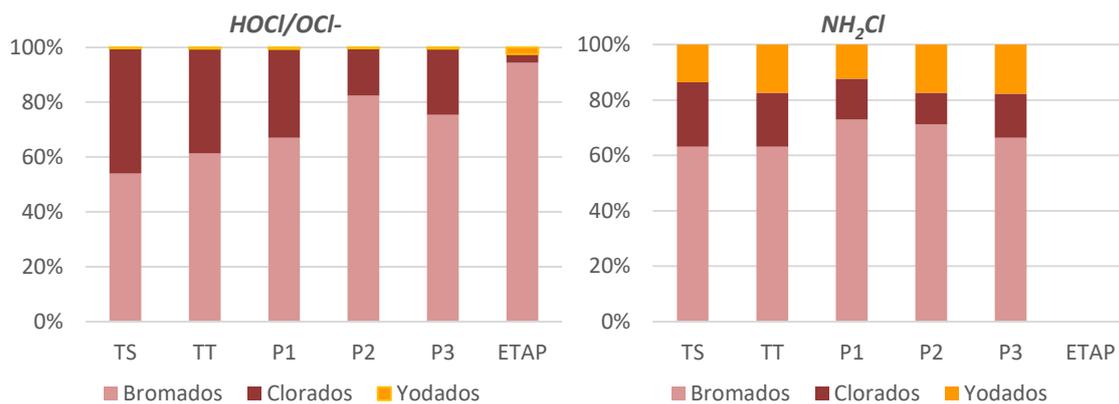


Figura 8. Contribución (%) de los DBPs en función de los halógenos en su estructura.

Al evaluar las especies de DBPs formadas, las especies de *Tri-HALs* que mayoritariamente se forman en presencia de cloro en las aguas de salida del secundario, del terciario y de la tubería (P1) son aquellas que contienen un mayor número de átomos de cloro (TCAL y BDCAL), a pesar de las elevadas concentraciones de ion bromuro de estas aguas. Mientras que en el resto de matrices adquieren relevancia las especies con más bromo (especialmente DBCAL en P2 y P3, y ésta y TBAL en ETAP). En presencia de cloramina, se favorece en todas las aguas la formación de las especies con bromo (TBAL y DBCAL > DCAL > TCAL), estando las concentraciones de TCAL y BDCAL por debajo de su respectivo LOQ.

Del mismo modo, en el caso de los *HANs*, el DCAN es la especie que se forma de manera mayoritaria en TS, TT y P1 en presencia de cloro, seguida de TBAN y DBAN, mientras que esta última adquiere más relevancia en P3 y ETAP. DCAN y DBAN son los HANs que se forman casi de forma exclusiva en las matrices investigadas en presencia de cloramina (excepto en P1, donde BDCAN también se detectó). Por su parte, el IAN se formó a niveles detectables, pero no cuantificables en TT, TS y P1, solo durante la cloración.

Dentro de la clase de las *HACMs*, las únicas especies encontradas fueron TCACM, BDCACM y DBCACM (en la mayoría de los casos a concentraciones <LOQ). Su formación se observó únicamente en el escenario clorado. Esto puede deberse en parte a los elevados límites de detección del método para estos compuestos. Cabe destacar, que la formación de TCACM y BDCACM se da solamente en aguas afectadas por la reutilización del agua, mientras que el punto P2 (aguas arriba del vertido en el río de las aguas del

terciario) solamente mostró potencial de formación de DBCAM. Ninguna HACM se detectó en el agua de la ETAP.

Finalmente, en cuanto a los *I-THMs*, los niveles observados fueron muy bajos, estando en la mayoría de los casos por debajo del LOQ (<0.15 µg/L, en promedio). El yodoformo (TIM) fue la única especie no detectada, mientras que las especies con más átomos de yodo se detectaron ocasionalmente, principalmente en muestras procedentes de un escenario de cloraminación, y siempre a concentraciones <LOQ. El agua de la ETAP presentó niveles muy bajos (<LOQ) de DBIM y CBIM (Figura 14).

Por lo general se puede concluir que el potencial de formación de las diferentes especies de DBPs en presencia de cloro apenas se modifica después del tratamiento terciario (Figuras 9 y 10), aunque sí que baja el PFDBP total.

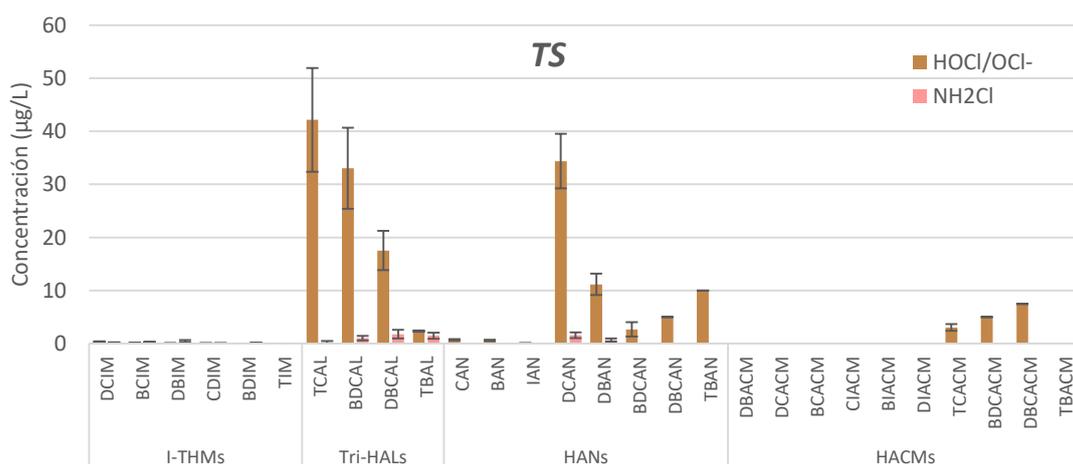


Figura 9. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz TS.

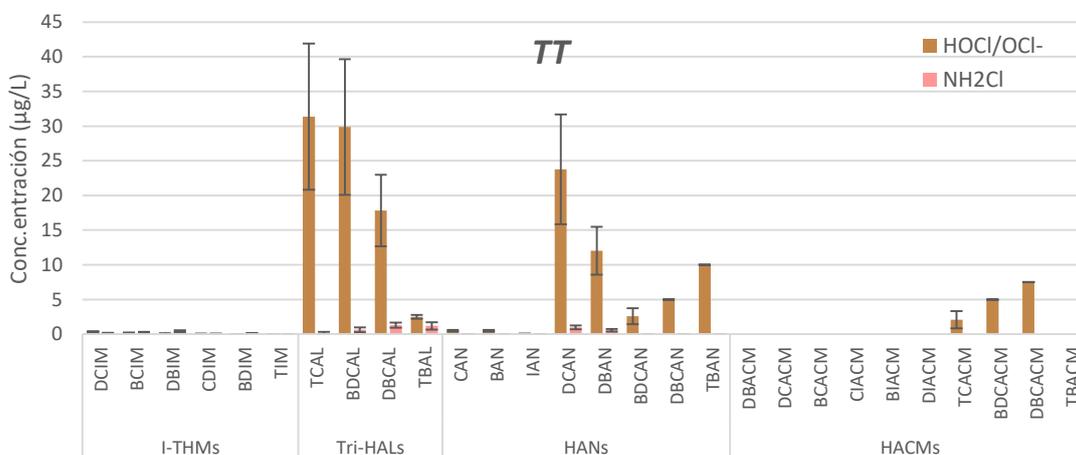


Figura 10. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz TT.

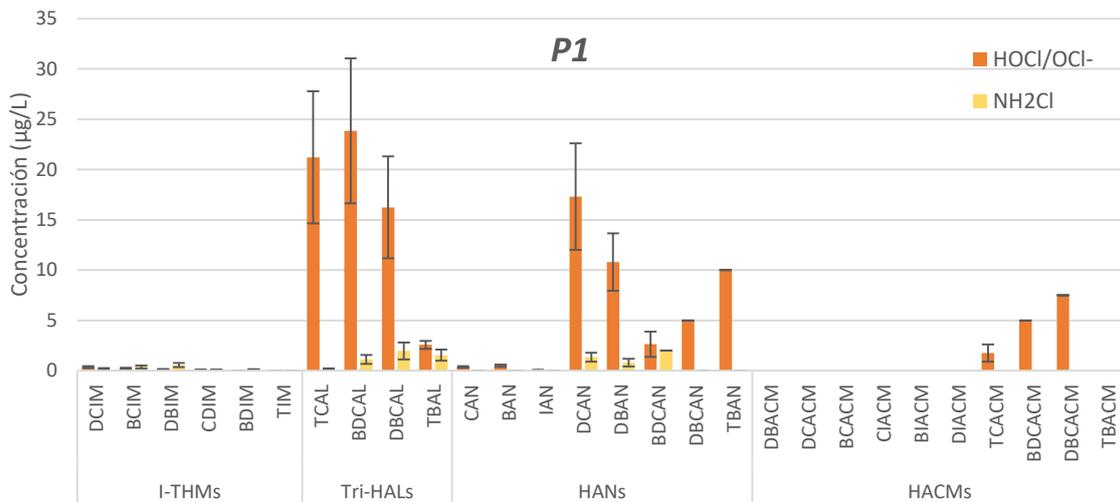


Figura 11. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz P1.

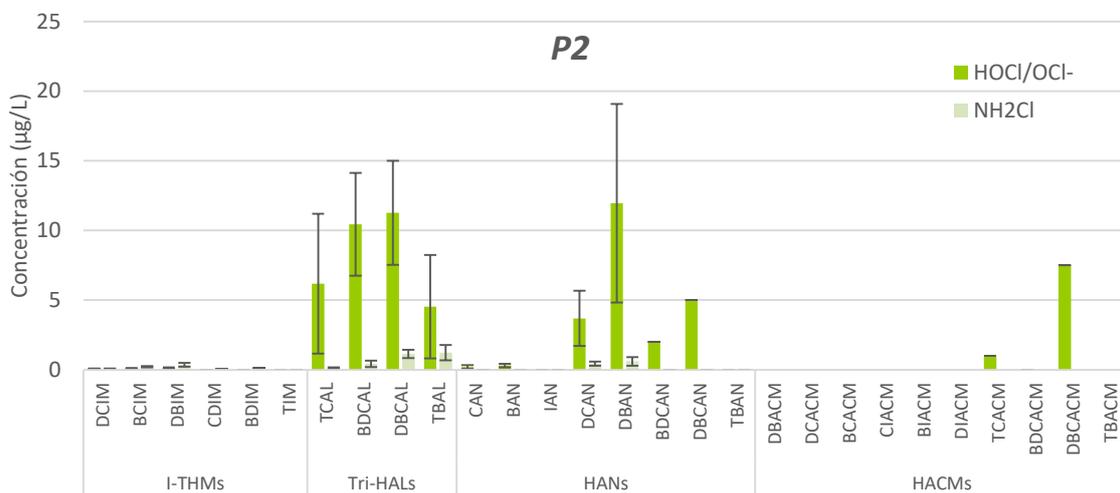


Figura 12. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz T2.

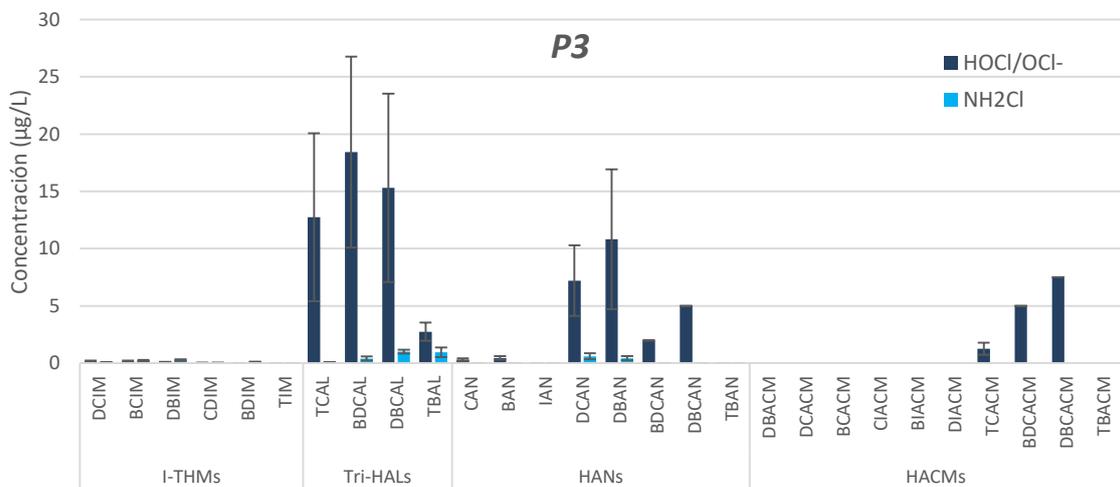


Figura 13. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz P3.

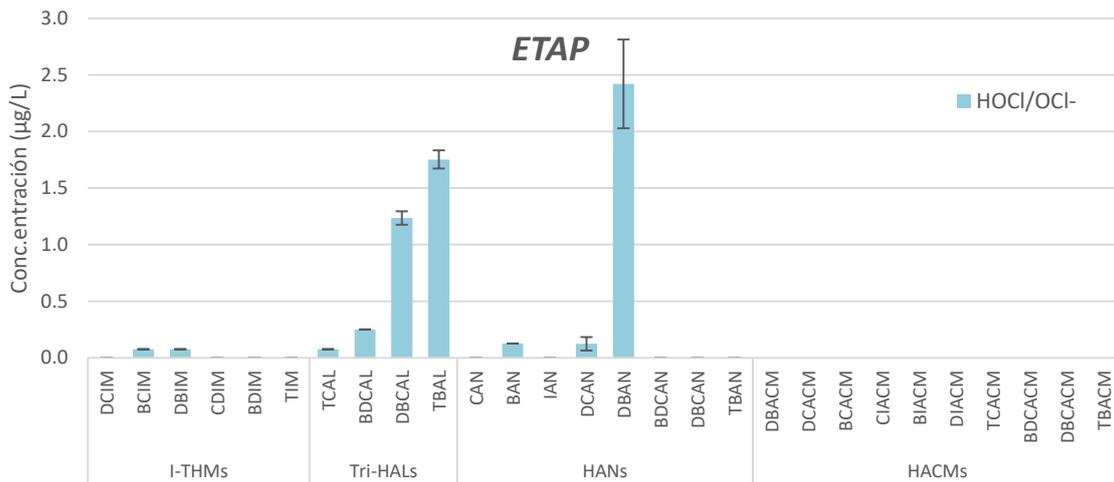


Figura 14. PFDBPs de las diferentes especies de DBPs en matriz ETAP.

o *PFDBPs según el proceso de desinfección*

Ahora bien, si además de analizar la formación de DBPs por tipo de matriz investigada, evaluamos lo que ocurre en cada clase, podemos observar nueva información como el aumento en la formación de I-THMs debido a los procesos de cloraminación y no así de cloración, como se visualizaba en los gráficos anteriores, y confirmando lo expuesto en la sección 2.2.3.

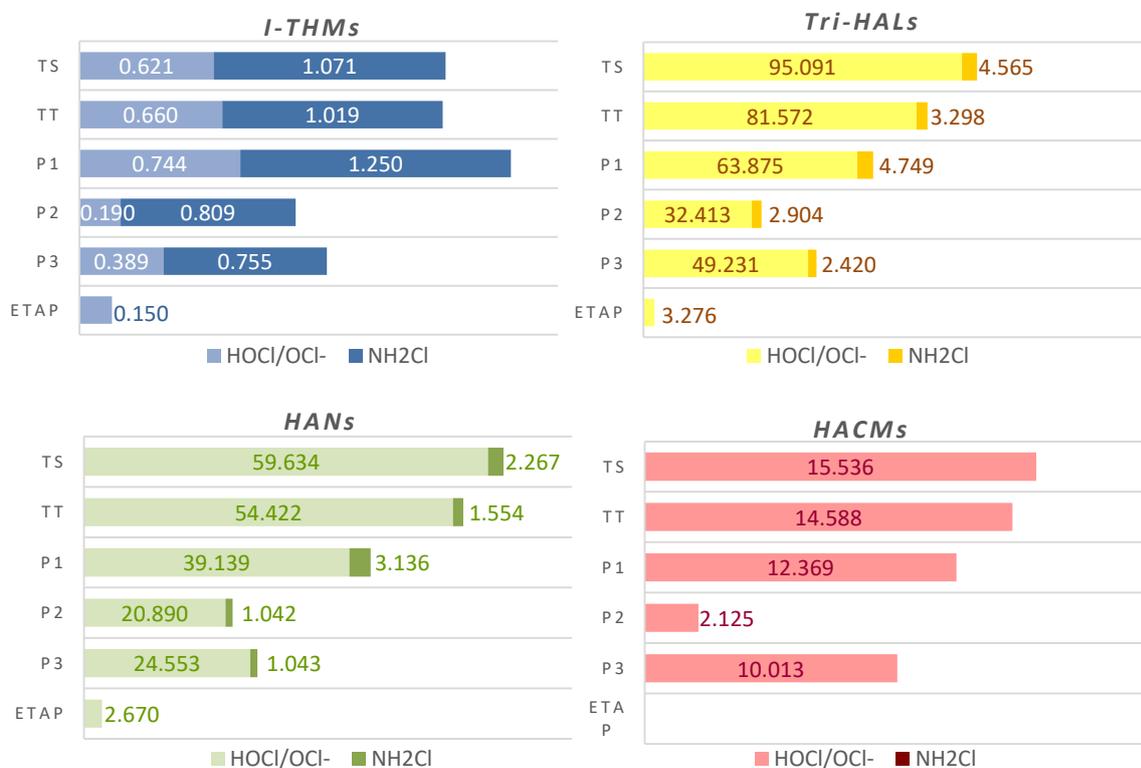


Figura 15. PFDBPs de las clases de DBPs, en función del proceso de desinfección (µg/L).

Por su parte, tal como fuera mencionado en el marco teórico, al analizar los resultados para la ETAP se corrobora que los Tri-HALs es una de las clases de DBPs más relevantes en agua; siendo la tercera más abundante después de los THMs y HAAs, DBPs no considerados en este estudio.

En cuanto a la formación de DBPs con nitrógeno como HANs y HACMs, en este estudio se detectaron niveles mayores de estos compuestos en las aguas cloradas que cloraminadas. La formación de este tipo de compuestos está asociada a los elevados niveles de TON en las aguas investigadas, razonamiento señalado en estudios previos como Le Roux et al. (2016). Estudios previos, como el de Jia et al. (2016), realizado en torno a los precursores y factores que afectan a la formación de HANs durante la cloración y cloraminación de compuestos orgánicos nitrogenados en el agua potable, indican una mayor formación de este tipo de compuestos durante la cloración del agua, de acuerdo a lo observado en nuestro estudio.

5.2 Análisis no dirigido

5.2.1 Elaboración de una lista de compuestos sospechosos “Suspect list”

La revisión de artículos científicos publicados en el periodo 2002-2012 y 2020, mediante la base de datos *Scopus*, relacionados al término de búsqueda “*Chlorination transformation products*” contribuyó al ingreso de 223 compuestos a una *suspect list* de compuestos clorados que se mantiene en elaboración. Esta lista de compuestos contiene en la actualidad 1472 entradas correspondientes a productos de transformación de 136 contaminantes orgánicos antropogénicos y subproductos de desinfección halogenados de bajo peso molecular, en su mayoría (>92%) detectables mediante LC-HRMS.

La mayor parte de la contribución realizada en el marco de este TFM se focalizó en los grupos de fármacos y productos industriales, y contemplaba mayormente DBPs que pueden ser analizados mediante LC-HRMS usando electroespray (ESI) como fuente de ionización. La *Tabla 5* muestra a modo de ejemplo la información extraída del trabajo

realizado por Li et al. (2011) acerca de la transformación del fármaco oxcarbazepina durante su cloración.

Si bien esta revisión contribuyó a completar la lista de DBPs potenciales de formarse durante la cloración del agua, el propósito de esta tarea era aplicar dicha lista para evaluar mezclas de DBPs analizadas mediante LC-HRMS con un enfoque no dirigido. Sin embargo, debido a la situación sanitaria excepcional presentada y su subsecuente estado de alarma, esta tarea no ha podido realizarse en el marco de este TFM.

No obstante, no cabe duda, que será una herramienta de gran utilidad para la identificación de DBPs en el futuro mediante LC-HRMS.

Tabla 5. Información del compuesto oxcarbazepina presentada en la suspect list

DATA	PARENT		PRODUCTS		
ID	EOC-60	CI-400	CI-401	CI-402	CI-403
Family	Pharmaceutical	Pharmaceutical	Pharmaceutical	Pharmaceutical	Pharmaceutical
Group	Antiepileptic	Antiepileptic	Antiepileptic	Antiepileptic	Antiepileptic
Tet	Oxcarbazepine	Oxcarbazepine	Oxcarbazepine	Oxcarbazepine	Oxcarbazepine
Systematic Name	10-oxo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamide	10-chloro-11-oxo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepine-5-carboxamide	10,10-dichloro-11-oxo-10,11-dihydro-5H-dinezo[b,f]azepine-5-carboxamide	1,1-bis(2-formylphenyl)urea	2-(2,4-dioxo-3,4-dihydroquinazolin-1(2H)-yl)benzaldehyde
Smiles	<chem>O=C1CC2=C(C=C2)N(C(N)=O)C3=C1C=CC=C3</chem>	<chem>O=C1C(Cl)C2=C(C=CC=C2)N(C(N)=O)C3=C1C=CC=C3</chem>	NA (several positional isomers possible)	<chem>O=CC1=C(N(C(N)=O)C(C=CC=C2)=C2C=O)C=CC=C1</chem>	<chem>O=C1C2=CC=CC=C2N(C3=C(C=O)C=CC=C3)C(N1)=O</chem>
Mol. Weight	252.0899	286.0509	320.0119	268.0848	266.0691
Elemental Composition	C15H12N2O2	C15H11ClN2O2	C15H10Cl2N2O2	C15H12N2O3	C15H10N2O3
StInch	InChI=1S/C15H12N2O2/c16-15(19)17-12-7-3-1-5-10(12)9-14(18)11-6-2-4-8-13(11)17/h1-8H,9H2,(H2,16,19)	InChI=1S/C15H11ClN2O2/c16-13-9-5-1-3-7-11(9)18(15(17)20)12-8-4-2-6-10(12)14(13)19/h1-8,13H,(H2,17,20)	NA	InChI=1S/C15H12N2O3/c16-15(20)17(13-7-3-1-5-11(13)9-18)14-8-4-2-6-12(14)10-19/h1-10H,(H2,16,20)	InChI=1S/C15H10N2O3/c18-9-10-5-1-3-7-12(10)17-13-8-4-2-6-11(13)14(19)16-15(17)20/h1-9H,(H,16,19,20)
CAS Number	28721-07-5	NA	NA	NA	869377-50-4
Lnchkey	CTRLABGOLIVAIY-UHFFFAOYSA-N	QPDCZPSRSKRNMU-UHFFFAOYSA-N	NA	BJPGZLSFTKFVDV-UHFFFAOYSA-N	TZCUDQGVRQPRCM-UHFFFAOYSA-N
CSID	31608	NA	NA	NA	73994879
Chromatog	LC	LC	LC	LC	LC
Ionization	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI
Preferable Ionization	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
[M+H] ⁺	253.0972	287.0582	321.0192	269.0921	267.0764
[M-H] ⁻	251.0826	285.0436	319.0046	267.0775	265.0618
Fragments Measured	253;236;210;208;180	NA	321;285	269;252;226;224;208;196	267;249;239;224;196
Detected in Real Samples	Not detected in tap water	Detected in 3 of 5 samples tap water			
Conc. (ng/L)	NA	NA	NA	NA	NA
Reference	https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.038				

Obs.: NA (Not available)

5.2.2 Resultados del análisis no dirigido

La mezcla de DBPs formados en presencia de cloro y cloraminas en la matriz de agua de salida del tratamiento terciario (TT), fue caracterizada mediante un enfoque no dirigido utilizando el programa *TraceFinder*, identificándose un total 37 DBPs halogenados, los cuales se presentan con mayor detalle en el Anexo C.

En cuanto a esta identificación, es importante señalar las siguientes particularidades:

- *DBPs confirmados*: 20 compuestos fueron confirmados con el uso de los patrones analíticos de los DBPs incluidos en el enfoque dirigido.
- *DBPs tentativos*: los 18 compuestos remanentes se proponen de forma tentativa gracias a la similitud en su estructura molecular (alta similitud espectral) o fórmula empírica.

Dicho esto, de los 20 compuestos confirmados, 17 fueron detectados a su vez en el análisis dirigido, siendo estos:

- *I-THMS*: DCIM, BCIM, DBIM, CDIM y BDIM
- *Tri-HALs*: TCAL, BDCAL, DBCAL y TBAL
- *HANs*: CAN, BAN, DCAN, DBAN, BDCAN y DBCAN
- *HACMs*: TCAM y BDCAM

Por su parte, los DBPs de la solución patrón que no fueron detectados en las muestras fueron: TIM, IAN, TBAN, DBACM, DCACM, BCACM, CIACM, BIACM, DIACM, DBCACM y TBACM. En el caso específico de TBAN, DBCACM y TBACM, los mismos tampoco fueron detectados por el método de procesamiento de datos en la muestra que contenía los patrones analíticos, por lo que se estima que para dichos DBPs el valor umbral de intensidad de la señal m/z establecido en el método debe estar por encima del necesario para detectar estos compuestos.

Entre los DBPs halogenados “desconocidos” identificados de forma tentativa (su estructura no ha sido confirmada mediante el análisis del patrón correspondiente) hay compuestos alifáticos (1,2-dicloro-2-metil-propano, 1-cloro-2-metil-2-propanol, 2,3-dicloro-2-metil-butano, 1,1-dimetil-3-cloropropanol, 1,1,1-tricloro-2-propanona, 1-bromo-1,1-dicloro-2-propanona, 2-bromo-4,6-di-tert-butilfenol) y aromáticos (cloro-benceno, y trans-1,3-diclorociclopentano). Por otro lado, se ha identificado la presencia

(esperada) de los trihalometanos, dibromoclorometano y bromoformo, cuya identidad si pudo ser confirmada con el análisis de patrones analíticos (Anexo C). En el caso de aquellos compuestos para los que no se obtuvo una coincidencia fiable en la librería de espectros de masas, se ha facilitado la formula empírica del ion mayoritario o de sus principales fragmentos.

Finalmente, al igual que ocurrió en los resultados de la sección anterior para los PFDBPs obtenidos mediante el análisis dirigido, las concentraciones observadas por lo general de estos compuestos fueron mayores en agua clorada que cloraminada, dándose excepciones en DBPS de la clase I-THMs (estimado en base a la intensidad del ion mayoritario en las diferentes muestras).

5.3 Ventajas e inconvenientes de análisis dirigido y no dirigido

Tal como se ha presentado en la sección 5.1 y 5.2, la caracterización de mezclas DBPs puede realizarse a través de dos enfoques: análisis dirigidos y no dirigidos. Ambos, presentan ventajas e inconvenientes, principalmente en cuanto a la cuantificación de los resultados y el alcance de los resultados esperados (*Figura 16*); dependiendo la selección de uno u otro enfoque principalmente del objetivo del estudio.

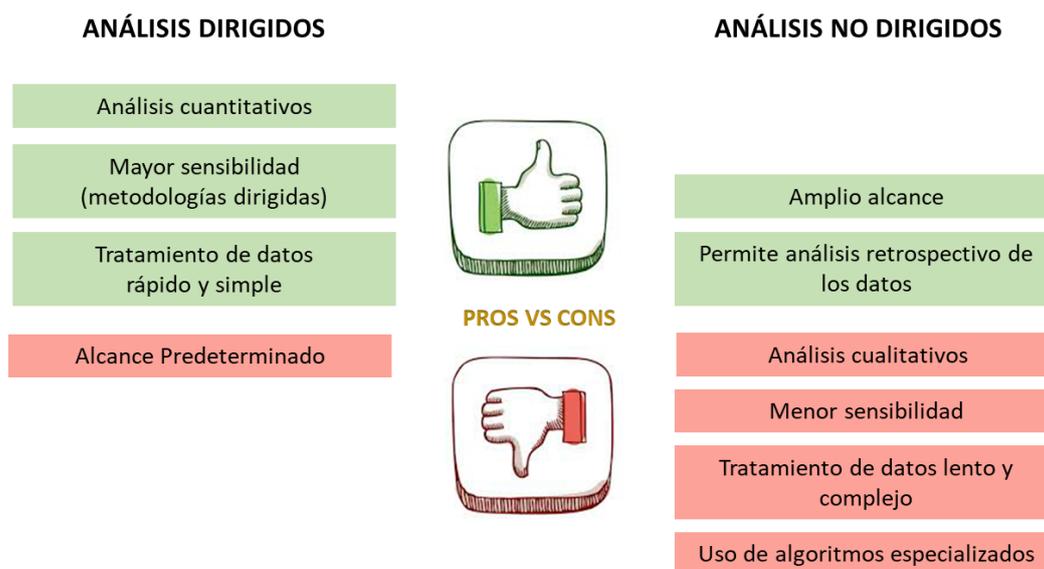


Figura 16. Cuadro comparativo del análisis dirigido vs análisis no dirigido en la caracterización de DBPs.

Ejemplo de esto en el presente trabajo, el uso del análisis dirigido permitió detectar DBPs de una manera simple y a concentraciones de $\mu\text{g/L}$, obteniendo, por ejemplo, en la matriz TT, la detección de 15 compuestos (10 compuestos cuantificados y cinco por debajo del LOQ) en agua clorada y 11 (ocho cuantificados y tres por debajo del LOQ) en agua cloraminada, de los 28 DBPs seleccionados inicialmente.

Por su parte, el análisis no dirigido permitió detectar 37 compuestos (20 confirmados y 17 propuestos tentativamente), no obstante, requiriendo para ello la verificación manual de 170 compuestos propuestos por el programa y demandando una mayor inversión de tiempo.

5.4 Priorización de DBPs

La *Tabla 6* muestra la toxicidad relativa (TEF) de los DBPs emergentes incluidos en el análisis dirigido, usando el ácido yodoacético como DBP de referencia y valores de toxicidad (citotoxicidad y genotoxicidad) reportados en la literatura observados en células de mamífero (células de ovario de hámster chino) (Wagner y Plewa, 2017) (más detalles en la sección 4.5).

En base a los valores de TEF, se puede observar que la clase de HACMs posee los analitos con mayor potencia tóxica, siendo las HACMs yodadas (DIACM y BIACM), las HACMs con mayor potencia citotóxica y genotóxica, respectivamente. Sin embargo, dado su escaso potencial de formación (no se detectaron en ninguna de las matrices ni en ninguno de los escenarios investigados), no serían DBPs prioritarios en el área investigada.

En referencia a la potencia citotóxica, las HACMs sería la clase más relevante, seguidas por los HANs, Tri-HALs y en último lugar, los I-THMS. En el caso de la potencia genotóxica, se dispone de un número menor de datos, por lo que según los valores de 50% TDNA disponibles, el orden parece mantenerse (aunque en el caso de los I-THMS, al disponer de un único dato, no puede señalarse una tendencia).

Orden de toxicidad = HACMs > HANs > Tri-HALs > I-THMS

Tabla 6. Concentración citotóxica (LC₅₀), genotóxica (50% TDNA) y toxicidad relativa (TEF_{CITO} y TEF_{GEN})

Clase	Analito	Citotoxicidad		Genotoxicidad	
		LC ₅₀ (M)	TEF _{CITO}	50%TDNA (M)	TEF _{GENO}
Referencia	IAA	2.95E-06	1.00E+00	8.70E+06	1.00E+00
I-THMs	DCIM	4.13E-03	7.14E-04	NA	-
	BCIM	2.42E-03	1.22E-03	NA	-
	DBIM	1.91E-03	1.54E-03	NA	-
	CDIM	2.40E-03	1.23E-03	2.95E-03	2.95E-03
	BDIM	1.40E-03	2.11E-03	NA	-
	TIM	6.60E-05	4.47E-02	NA	-
Tri-HALs	TCAL	1.16E-03	2.54E-03	NA	-
	BDCAL	2.04E-05	1.45E-01	4.70E-04	1.85E-02
	DBCAL	5.15E-06	5.73E-01	1.44E-04	6.04E-02
	TBAL	3.58E-06	8.24E-01	3.40E-04	2.56E-02
HANs	CAN	6.83E-05	4.32E-02	6.01E-04	1.45E-02
	BAN	3.21E-06	9.19E-01	3.85E-05	2.26E-01
	IAN	3.30E-06	8.94E-01	3.71E-05	2.35E-01
	DCAN	5.73E-05	5.15E-02	2.75E-03	3.16E-03
	DBAN	2.85E-06	1.04E+00	4.71E-05	1.85E-01
	BDCAN	NR	-	NR	-
	DBCAN	NR	-	NR	-
	TBAN	NR	-	NR	-
HACMs	DBACM	1.22E-05	2.42E-01	7.44E-04	1.17E-02
	DCACM	1.92E-03	1.54E-03	NA	-
	BCACM	1.71E-05	1.73E-01	5.83E-04	1.49E-02
	CIACM	5.97E-06	4.94E-01	3.02E-04	2.88E-02
	BIACM	3.81E-06	7.74E-01	7.21E-05	1.21E-01
	DIACM	3.78E-07	7.80E+00	3.39E-05	2.57E-01
	TCACM	2.05E-03	1.44E-03	6.54E-03	1.33E-03
	BDCACM	8.68E-06	3.40E-01	1.46E-04	5.96E-02
	DBCACM	4.75E-06	6.21E-01	6.94E-05	1.25E-01
	TBACM	3.14E-06	9.39E-01	3.25E-05	2.68E-01

Obs.: NR (DBP no investigado), NA (Dato no disponible), (-) No calculado. (Fuente: Wagner y Plewa, 2017)

Por su parte, al evaluar las especies respectivas a cada clase (*Tabla 7*), se observa que aquellos DBPs que contienen yodo o bromo en su estructura, presentan una mayor potencia tóxica, y por lo tanto son prioritarios para su monitorización, como se ha indicado en la literatura (Plewa et al., 2008a).

Tabla 7. Potencia tóxica de los DBPs según presencia de iones (yodo, bromo y cloro)

Clase		Orden de Toxicidad
I-THMs	Citotoxicidad	TIM > BDIM > DBIM > CDIM > BCIM > DCIM
Tri-HALs	Citotoxicidad	TBAL > DBCAL > BDCAL > TCAL
	Genotoxicidad	DBCAL > TBAL > BDCAL
HANs	Citotoxicidad	DBAN > BAN > IAN > CAN > DCAN
	Genotoxicidad	BAN > IAN > DBAN > CAN > DCAN
HACMs	Citotoxicidad	DIACM > TBACM > BIACM > DBCACM > CIACM > BDCACM > DBACM > BCACM > DCACM > TCACM
	Genotoxicidad	TBACM > DIACM > DBCACM > BIACM > BDCACM > CIACM > BCACM > DBACM > TCACM

Sin embargo, la priorización de DBPs también debe tener en consideración el potencial de formación de los mismos, que cambiará según el agua que se use en la desinfección y el proceso de desinfección en sí.

Para evaluar los DBPs prioritarios en la zona de estudio, se ha graficado el potencial citotóxico y genotóxico de las diferentes matrices investigadas en base a los DBPs cuantificados en cada una de ellas y la contribución de cada clase de DBP a la concentración equivalente tóxica acumulada o total en cada caso, en cuanto a la clase química investigada o al halógeno que contienen (*Figuras 17 y 18*).

De acuerdo a los resultados presentados en la *Figura 7*, el agua clorada exhibe un mayor potencial de citotoxicidad, en particular para las matrices TS y TT, en concordancia con los datos presentados para el PFDBPs en las secciones 5.1.2 y 5.2.2. Con respecto a la contribución por clases, tanto en las muestras cloradas como en las cloraminadas, destaca el papel de los Tri-HALs y HANs, siendo en las cloraminadas más evidente la contribución de los Tri-HALs.

Cabe recordar que ambas clases contaron con el mayor número de cuantificaciones, así como con concentraciones más elevadas en el análisis dirigido. Además, se observa que los compuestos bromados cuentan con una contribución mayoritaria en la potencia citotóxica de las matrices estudiadas, indicando que pese a la toxicidad de los iodo-DBPs

analizados, las concentraciones detectadas apenas contribuyen al potencial citotóxico de las mezclas.



Figura 17. Potencia citotóxica de las matrices de agua expresada en concentración de equivalentes tóxicos (TEQ) y la contribución relativa (%) de las clases de DBPs y la presencia de yodo, bromo o cloro en dicha toxicidad, en función del proceso de desinfección.

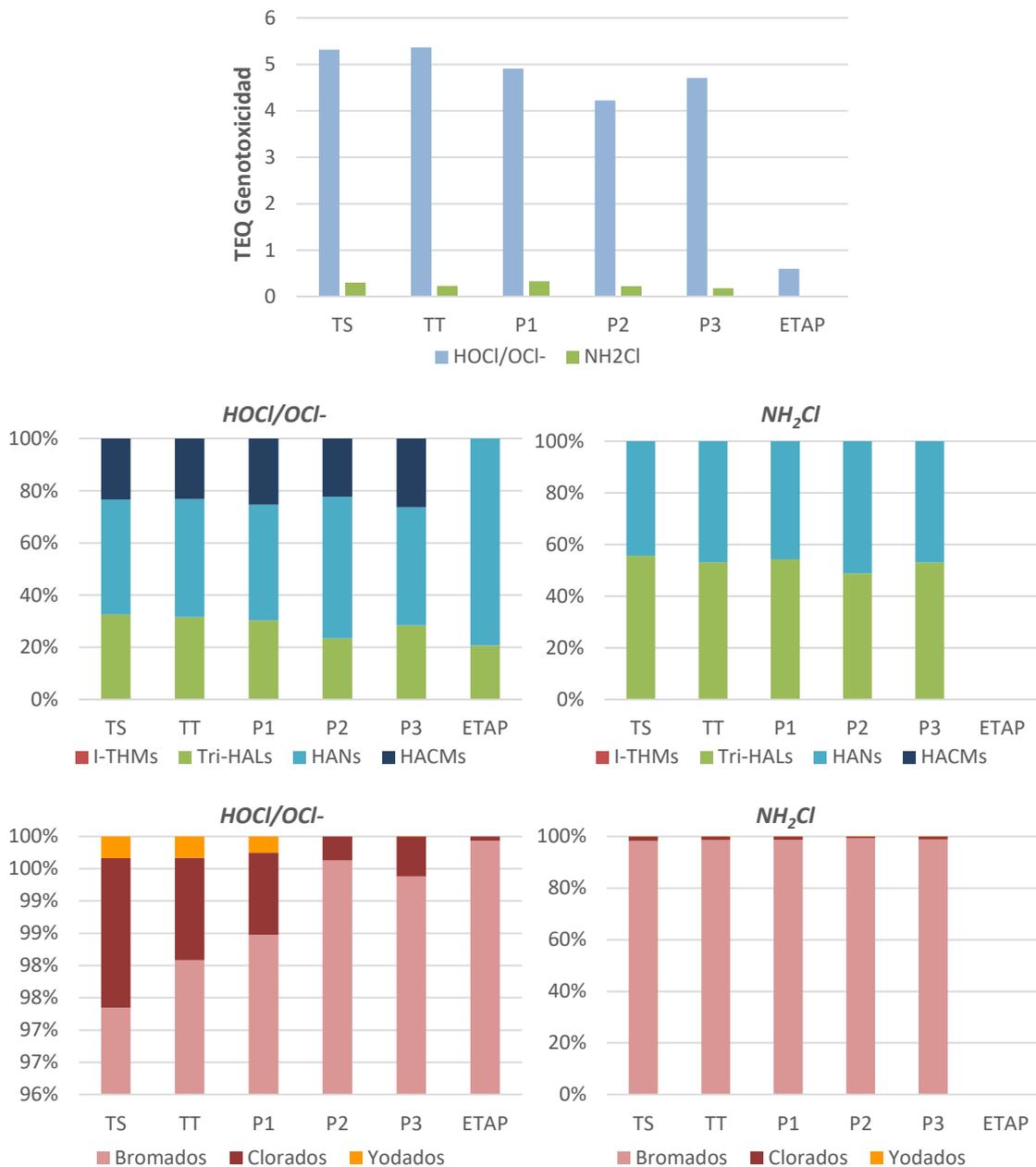


Figura 18. Potencia genotóxica de las matrices de agua expresada en concentración de equivalentes tóxicos (TEQ) y la contribución relativa (%) de las clases de DBPs y la presencia de yodo, bromo o cloro en dicha toxicidad, según el proceso de desinfección.

Igualmente, el potencial genotóxico de las matrices muestra resultados similares a la citotoxicidad previamente descrita.

Al comparar las Figuras 17 y 18, es evidente que la magnitud del TEQ genotóxico es mucho menor que el citotóxico, sin embargo, se observa el mismo orden de potencial genotóxico en las muestras (TS > TT > P1 > P2 > P3 > ETAP) y demuestra el papel relevante de los compuestos bromados en la potencia genotóxica de las aguas.

En cambio, al evaluar la contribución relativa de las clases DBPs, si bien los Tri-HALs y HANs son superiores, estos últimos DBPs nitrogenados contribuyen de mayor manera a la potencia genotóxica estimada en las muestras cloradas, atribuyéndose a que el TEF genotóxico es mayor para las clases HANs que las Tri-HALs.

Es importante resaltar que los TEQs calculados para las diferentes aguas probablemente sean más altos que los reales, ya que el enfoque utilizado considera que las concentraciones de DBPs en el agua serían totalmente biodisponibles y entrarían en su totalidad en las células y por otro lado, ignora sinergias y antagonismos que pueden darse en la mezcla debido a la múltiple presencia de compuestos. Además, la extrapolación de las observaciones *in vitro* a organismos enteros también conlleva diferentes grados de incerteza. Sin embargo, es un buen enfoque para priorizar aquellos DBPs en la mezcla que pueden ser los principales causantes de potenciales efectos tóxicos.

En este sentido, tras realizar la evaluación de ambos potenciales tóxicos, se propone que los DBPs prioritarios en esta área de estudio deben ser aquellos correspondientes a las clases Tri-HALs y HANs, especialmente los compuestos que contienen bromo en su estructura. De igual forma, si bien se destacó el potencial tóxico que presentan las HACMs y los compuestos yodados, es evidente que, dada su bajo potencial de formación en las matrices investigadas, su contribución al potencial tóxico de las mezclas no es relevante, generando una menor preocupación.

6 Conclusiones

La desinfección del agua representa un proceso fundamental a nivel mundial para asegurar el saneamiento y garantizar el acceso a recursos de calidad, eliminando microorganismos patógenos y erradicando enfermedades relacionadas con el agua. No obstante, estudios han demostrado que al utilizar desinfectantes comunes pero grandes oxidantes, como el cloro y la cloramina, ocurren reacciones con los compuestos presentes en el agua y se generan los llamados DBPs.

El presente trabajo realizó una caracterización de las mezclas de DBPs que se forman en cinco matrices de agua (agua superficial – potable – residual – regenerada) sometidas a ensayos de PFDBPs con cloro y cloramina. Para ello se utilizaron dos enfoques: análisis dirigido y análisis no dirigidos.

Al utilizarse el análisis dirigido para cuatro clases de DBPs emergentes seleccionados (I-THMs, Tri-HALs, HANs y HACMs), se evidenció que los mayores PFDBPs se dan en presencia de cloro y, a su vez, que las matrices relacionadas al agua residual tratada (mediante tratamiento secundario y terciario), debido a sus altos niveles de TOC, son las que presentan un mayor potencial de formaciones de DBPs. De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observa una reducción drástica del TOC y PFDBPs del agua entre el tratamiento secundario y terciario. Por otro lado, el vertido de la salida del terciario al río tampoco tiene un efecto en el potencial de formación del agua que sale de la potabilizadora, ya que el tren de tratamientos realizado en la misma permite reducir las concentraciones de DBPs un 93% con respecto al agua que se capta.

El único aspecto que podría preocupar en cuanto al PFDBPs de las aguas investigadas es la formación, en el agua de salida de la ETAP, de yodo-DBPs (I-THMs) dado el potencial tóxico asociado a los DBPs-yodados. Sin embargo, según el análisis de potencial de toxicidad realizado, las concentraciones detectadas (por debajo del LOQ del método, en general $<0.15 \mu\text{g/L}$) no suponen un gran aporte al potencial de toxicidad total estimado para estas muestras.

En cuanto a los DBPs formados, la clase de los Tri-HALs presentó los mayores niveles de concentración en todas las muestras investigadas, seguida de los HANs. Las dos clases

restantes, HACMs y I-THMs, o apenas se detectaron o los DBPs correspondientes presentaban valores por debajo del LOQ del método. En el caso de las HACMs, esto puede atribuirse a los elevados límites de detección del método de análisis utilizado para esta clase de DBPs.

El alto contenido de bromuro presente en las aguas analizadas, contribuyó en gran medida a la formación de DBPs, generándose más de un 50% de subproductos con bromo en su estructura en todas las muestras. La baja contribución de yodo-DBPs al total de DBPs formados se atribuye a la ausencia de una fuente relevante de yodo en las matrices investigadas.

El análisis no dirigido de las mezclas de DBPs generadas implica un tratamiento de datos más lento y complejo que el enfoque anterior, requiriendo una elevada inversión de tiempo. No obstante, al no centrarse en patrones analíticos de compuestos predeterminados, mostró un mayor alcance, permitiendo identificar en total 37 DBPs halogenados y conocer una mejor realidad de las muestras de agua. De estos 37 DBPs, 20 fueron confirmados utilizando patrones analíticos y 17 se propusieron de forma tentativa. Al igual que se observó con el enfoque dirigido, las concentraciones observadas en general fueron mayores en las muestras cloradas y no así en las cloraminadas.

Debido a que los DBPs seleccionados en el enfoque dirigido no están regulados, y en vista de que producen efectos tóxicos y genotóxicos en células de mamíferos, se realizó un ejercicio de priorización en base a su potencia tóxica relativa y su potencial de formación en las aguas, con el fin de identificar las especies más relevantes para futuros estudios y regulaciones a aplicarse en el área de estudio. En base a los resultados obtenidos, los DBPs prioritarios en el área de estudio son las clases de Tri-HALs y HANs, especialmente aquellos que contienen bromo en su estructura. Los I-THMs y las HACMs a pesar de presentar un mayor potencial de toxicidad que las clases de DBPs anteriores no serían relevantes debido a su escaso potencial de formación en las aguas investigadas.

Dado que los enfoques de análisis mencionados previamente se aplicaron al tratamiento de datos obtenidos con GC-HRMS, es importante indicar que solo se está caracterizando

la fracción de la mezcla de DBPs que puede ser detectada usando esta técnica analítica (DBPs volátiles y semivolátiles). El uso de diferentes técnicas analíticas ampliaría el conocimiento de las mezclas de DBPs formadas. Es por ello, que en el marco de este TFM también se ha completado una lista de compuestos sospechosos o “suspect list” para su utilización en el análisis no dirigido de datos obtenidos con LC-HRMS. Mediante la revisión de artículos científicos, se aumentó con 223 entradas la lista existente (en la actualidad con 1472 compuestos), correspondientes a DBPs de contaminantes orgánicos antropogénicos y DBPs halogenados de bajo peso molecular que se podrían formar potencialmente durante la cloración del agua. No obstante, debido al estado de alarma proclamado en todo el territorio, la aplicación de esta lista a muestras reales no pudo realizarse.

Como futuras líneas de investigación, sería interesante explorar las mezclas de DBPs con LC-HRMs con enfoques no dirigidos, pues aún existe un porcentaje importante de DBPs desconocidos y dicha herramienta presenta un potencial de gran utilidad para su identificación. Por otro lado, habría que trabajar en confirmar las estructuras de aquellos DBPs identificados de forma tentativa en este trabajo, para poder desarrollar métodos de análisis cuantitativos y evaluar la relevancia de los mismos, en cuanto a su potencial de formación y su potencial tóxico.

7 Referencias bibliográficas

- Advanced Water Management Centre (2012). *Procedimiento operativo estándar para el análisis de DBPs* SOP No: AWMC-60-624-0009.01. Universidad de Queensland. Australia.
- Amy, G. (2007). USA or Europe: who is the true world leader in drinking water technology. 59e Vakantiecursus en Drinkwatervoorziening y 26e Vakantiecursus en Riolering & Afvalwaterbehandeling. pp. 19-27. Amsterdam. IOS Press.
- Baird, R., & Bridgewater, L. (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23rd edition. American Water Works Association (AWWA, WEF and APHA). Washington, D.C.
- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J., Kroner, R.C. (1974). Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *J Am Water Works Assoc.* Vol 66(12), pp. 703-706.
- Brass, H.J., Feige, M.A., Halloran, T., Mello, J.W., Munch, D., Thomas, R.F. (1977). The national organic monitoring survey: samplings and analysis for purgeable organic compounds. Pojasek, R.B. Ed. *Drinking Water Quality Enhancement Through Source Protection*. Ann Arbor Science, pp. 393-416.
- Bu, Q., Wang, D., Wang, Z. (2013). Review of screening systems for prioritizing chemical substances. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Vol. 43(19), pp. 1011-1041.
- Burns, E., Carter, L., Snape, J., Thomas-Oates, J., Boxall, A. (2018). Application of prioritization approaches to optimize environmental monitoring and testing of pharmaceuticals. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. Vol. 21(3), pp. 115-141. Taylor and Francis Inc.
- Cantor, K.P., Villanueva, C.M., Silverman, D.T., Figueroa, J.D., Real, F.X., Garcia-Closas, M., Malats, N., Chanock, S., Yeager, M., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Castaño-Vinyals, G., Samanic, C., Rothman, N., Kogevinas, M. (2010). Polymorphisms in GSTT1, GSTZ1, and CYP2E1, disinfection by-products, and risk of bladder cancer in Spain. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 118, pp. 1545-1550.
- Comisión Europea. (2020). Documento guía para procedimientos analíticos de control de calidad y validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos No. SANTE/12682/2019. [En Línea]. Disponible en https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727 [Consultado el día 18 de junio de 2020]
- Duirk, S.E., Lindell, C., Cornelison, C.C., Kormos, J., Ternes, T.A., Attene-Ramos, M., Osiol, J., Wagner, E.D., Plewa, M.J., Richardson, S.D. (2011). Formation of toxic iodinated disinfection by-products from compounds used in medical imaging. *Environmental Science and Technology*. Vol. 45 (16), pp. 6845-6854.
- García, D. (2020). “Vidas salvadas por la cloración del agua” en *Cuaderno de Cultura científica*. [En Línea]. Disponible en <https://culturacientifica.com/2020/01/23/vidas-salvadas-por-la-cloracion-del-agua/> [Consultado el día 04 de mayo de 2020]

- Health Canada. (2020). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Summary Table. Government of Canada. [En Línea] Disponible en <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/water-quality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table.html#t2> [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- Huang, H., Chen, B., Zhu, Z. (2017). Formation and speciation of haloacetamides and haloacetonitriles for chlorination, chloramination, and chlorination followed by chloramination. *Chemosphere*. Vol. 166, pp. 126-134.
- Huang, H., Wu, Q.Y., Hu, H.Y., Mitch, W.A. (2012). Dichloroacetonitrile and dichloroacetamide can form independently during chlorination and chloramination of drinking waters, model organic matters, and wastewater effluents. *Environmental Science and Technology*. Vol. 46(19), pp. 10624-10631.
- ISO 3534 (1993). Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: Probability and general statistical terms ISO 3534-1:1993. International Organization for Standardization. Geneva.
- Jeong, C.H., Wagner, E.D., Siebert, V.R., Anduri, S., Richardson, S.D., Daiber, E.J., et al. (2012). Occurrence and toxicity of disinfection byproducts in European drinking waters in relation with the HIWATE epidemiology study. *Environmental Science Technology*. Vol. 46(21), pp. 12120–12128.
- Jia, A., Wu, C., Duan, Y. (2016). Precursors and factors affecting formation of haloacetonitriles and chloropicrin during chlor(am)ination of nitrogenous organic compounds in drinking water. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 308, pp. 411-418.
- Khiari, D., Krasner, S.W., Hwang, C.J., Chinn, R., Barrett, S. (1997). Proceedings of the 1996 American Water Works Association water quality technology conference. American Water Works Association. Denver, Colorado.
- Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Scilimenti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D. Jr. (2006). Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environmental Science and Technology*. Vol. 40 (23), pp. 7175-7185.
- Le Roux, J., Gallard, H., Croué, J. (2010). Formation of NDMA by chloramination of nitrogenous pharmaceuticals. *Water Practice and Technology*. Vol. 5 (4). IWA Pub.
- Le Roux, J., Nihemaiti, M., Croué, J. (2016). The role of aromatic precursors in the formation of haloacetamides by chloramination of dissolved organic matter. *Water Research*. Vol. 88, pp. 371-379.
- Lenntech. (2020). Historia desinfección del agua. [En Línea]. Disponible en <https://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/historia/historia-desinfeccion-agua.htm> [Consultado el día 04 de mayo de 2020]
- Li, Z., Fenet, H., Gomez, E., Chiron, S. (2011). Transformation of the antiepileptic drug oxcarbazepine upon different water disinfection processes. *Water Research*. Vol. 45(4), pp. 1587-1596

- Liviac, D., Creus, A., Marcos, R. (2010). DNA damage induction by two halogenated acetaldehydes, byproducts of water disinfection. *Water Research*. Vol. 44(8), pp. 2638-2646.
- MHLW. (2008). 4. Water Quality. Ministry of Health, Labour and Welfare. [En Línea]. Disponible en https://www.mhlw.go.jp/english/policy/health/water_supply/4.html [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- Mian, H., Hu, G., Hewage, K., Rodríguez, M., Sadiq, R. (2018). Prioritization of unregulated disinfection by-products in drinking water distribution systems for human health risk mitigation: A critical review. *Water Research*. Vol. 147, pp. 112-131. Elsevier Ltd.
- Ministry of Health People's Republic of China. (2006). Standards for Drinking Water Quality. GB 5749-2006. Ministry of Health People's Republic of China. [En Línea]. Disponible en <http://tradechina.dairyaustralia.com.au/wp-content/uploads/2018/08/GB-5749-2006-Standards-for-Drinking-Water-Quality.pdf> [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- Ministry of Health. (2019). Drinking-water Standards for New Zealand 2005 (Revised 2018). Ministry of Health. [En Línea]. Disponible en <https://www.health.govt.nz/publication/drinking-water-standards-new-zealand-2005-revised-2018> [Consultado el día 21 de junio de 2020]
- NHRMC. (2018) Australian Drinking Water Guidelines (ADWG). National Health and Medical Research Council. [En Línea]. Disponible en <https://www.nhmrc.gov.au/about-us/publications/australian-drinking-water-guidelines> [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- OMS. (2017). Hojas informativas sobre enfermedades relacionadas con el agua. *Agua, saneamiento e higiene*. Organización Mundial de la Salud. [En Línea]. Disponible en https://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/es/ [Consultado el día 27 de abril de 2020]
- OMS. (2018). Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum (chapters). Organización Mundial de la Salud. [En Línea]. Disponible en https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gdwq4-with-add1-chapters/en/ [Consultado el día 21 de junio de 2020]
- ONU. (2020). Objetivo 6: Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos. Organización de las Naciones Unidas. [En Línea]. Disponible en <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/water-and-sanitation/> [Accesado el día 27 de abril de 2020]
- Plewa, M.J., Muellner, M.G., Richardson, S.D., Fasano, F., Buettner, K.M., Woo, Y.T., Mckague, A.B., Wagner, E.D. (2008b). Occurrence, synthesis, and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of haloacetamidas: an emerging class of nitrogenous drinking water disinfection byproducts. *Environmental Science and Technology*. Vol. 42, pp. 955-961.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Muellner, M.G., Hsu, K.M., Richardson, S.D. (2008a). Comparative mammalian cell toxicity of N-DBPs and C-DBPs. Karanfi, IT., Krasner, SW., Westerhoff, P., Xie, Y (eds). Occurrence, formation, health effects, and control of disinfection by-products in drinking water. Vol. 995, pp. 36-50. American Chemical Society.

- Pochodylo, A., y Helbling, D. (2017). Emerging investigators series: prioritization of suspect hits in a sensitive suspect screening workflow for comprehensive micropollutant characterization in environmental samples. *Environmental Science: Water Research and Technology*. Vol. 3(1), pp. 54-56.
- Postigo, C. y Richardson, S.D. (2014). Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 279, pp. 461-475. Elsevier B.V.
- PUB. (2019). Singapore Drinking Water Quality. Water Quality Department, Singapore's National Water Agency. [En Línea]. Disponible en https://www.pub.gov.sg/Documents/Singapore_Drinking_Water_Quality.pdf [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- Richardson, S. y Postigo, C. (2015). "Formation of DBPs: State of the Science" en *Recent Advances in Disinfection By-Products*. Chapter 11pp, 189-214; *ACS Symposium Series*. Vol. 1190. Washington, DC. American Chemical Society.
- Richardson, S.D. y Postigo, C. (2011). Drinking Water Disinfection By-products. D. Barceló (ed.), *Emerging Contaminants and Human Health – The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol. 20, pp 93-138. Heidelberg, Berlin. Springer-Verlag.
- Richardson, S.D. y Postigo, C. (2016). Chapter 11. Discovery of New Emerging DBPs by High-Resolution Mass Spectrometry. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 71., pp. 335-356. Elsevier B.V.
- Richardson, S.D., Fasano, F., Ellington, J.J., Crumley, F.G., Buettner, K.M., Evans, J.J., Blount, B.C., Silva, L.K., Waite, T.J., Luther, G.W., McKague, A.B., Miltner, R.J., Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2008). Occurrence and mammalian cell toxicity of iodinated disinfection byproducts in drinking water. *Environmental Science and Technology*. Vol. 42(22), pp. 8330-8338.
- Richardson, S.D., Plewa, M., Wagner, E., Schoeny, R., DeMarini, D. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Vol. 6363 (1-3), pp. 178-242.
- Richardson, S.D., Thruston, A.D. Jr., Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Miltner, R.J., Schenck, K.M., et al. (2008c). Integrated disinfection by-products mixtures research: Comprehensive characterization of water concentrates prepared from chlorinated and ozonated/postchlorinated drinking water. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. Vol. 71(17), pp. 1165–1186.
- Rook, J.J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat Examination*. Vol. 23, pp. 234-243.
- Sawyer, C. y McCarty, P. (1978). "Chapter 19 – Residual Chlorine and Chlorine Demand" en *Chemistry for environmental engineering*. 3rd ed. New York, McGraw-Hill.
- Tang, Y., Long, X., Wu, M., Yang, S., Gao, N., Xu, B., Dutta, S. (2020). Bibliometric review of research trends on disinfection by-products in drinking water during 1975 – 2018. *Separation and Purification Technology*. Vol. 241. Elsevier B.V.

- Thun, M., Linet, M.S., Cerhan, J.R., Haiman, C.A., Schottenfeld, D., 2017. Cancer Epidemiology and Prevention. 4ed. Oxford University Press.
- UE. (2015). Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Consejo de la Unión Europea. [En Línea]. Disponible en <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A31998L0083> [Consultado el día 22 de junio de 2020]
- US EPA. (1979). National interim primary drinking water regulations: control of trihalomethanes in drinking water: Final rules. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos. Fed Register 44:68624-68705.
- US EPA. (2015). National Recommended Water Quality Criteria - Human Health Criteria Table. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos. [En Línea]. Disponible en <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-human-health-criteria-table#main-content> [Consultado el día 21 de junio de 2020]
- US EPA. (2020). Stage 1 and Stage 2 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rules. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos. [En Línea]. Disponible en <https://www.epa.gov/dwreginfo/stage-1-and-stage-2-disinfectants-and-disinfection-byproducts-rules#main-content> [Consultado el día 21 de junio de 2020]
- Wagner, E. y Plewa, M. (2017). CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. Journal of Environmental Sciences. Vol. 58, pp. 64-76.
- Weinberg, H.S., Krasner, S.W., Richardson, S.D, Thruston, A.D. Jr. (2002). The occurrence of disinfection by-products (DBPs) of health concern in drinking water: results of a nationwide DBP occurrence study. EPA/600/R02/068. [En Línea]. Disponible en https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NERL&dirEntryId=63413 [Consultado el día 05 de junio de 2020]
- Zwiener, C. y Richardson, S.D. (2005). Drinking water disinfection by-product analysis by LC/MS and LC/MS/MS. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Vol. 24 (7), pp. 613-621.