

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Química



**PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA
RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE MATERIA
ORGÁNICA Y MICROORGANISMOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Sergio Navalón Oltra

Dirigida por:

Dr. Hermenegildo García Gómez

Dra. Mercedes Álvaro Rodríguez

Valencia, 2010

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Una vez llegado al final de la tesis y echando la mirada atrás me doy cuenta de toda la gente a la que le tengo algo que agradecer, y que de una manera u otra ha contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, quería agradecer a Hermenegildo García Gómez y a Mercedes Álvaro Rodríguez la posibilidad de haber trabajado en su grupo de investigación.

A la Universidad Politécnica de Valencia por haberme concedido una beca/contrato del Programa Cantera de la UPV.

Al Professor Simon Parsons y a la Dr. Emma Goslan del Centre for Water Science (Cranfield University, UK) por haberme permitido trabajar y disfrutar unos meses con todos ellos.

A la gente de Aguas de Valencia por su apoyo cuando lo he necesitado. En especial nombrar al laboratorio de la planta potabilizadora de La Presa (Lorenzo, Paco, Patricia, Filo, Jose, Sonia...), así como a los laboratorios GAMASER.

Agradecer también al Departamento de Ingeniería Química de la UPV, y en concreto a Isabel Alcaina la oportunidad de haber colaborado con ellos durante cierto tiempo en la planta de membranas.

También quería agradecer su ayuda y compañía a la gente del Departamento de Química. Llevo tanto tiempo aquí que de cada uno podría escribir muy buenos recuerdos. A mis compañeros del Laboratorio 2-5, y especialmente a Javi, Miriam, Belén, Esther, Bogdan etc. en mis inicios en este mundillo y a las nuevas generaciones con Roberto, Maykel, Mireia, Murthy, David1 y David2 con los que hemos pasado muchos, y muy buenos momentos. También agradecer a todos los de mi grupo del ITQ su ayuda en cualquier cosa que me hace falta (Raquel, Canijo, Fran, Xesc, Ana, Nacho, Laura, Esther, Abde, Pedro, Abad etc.).

A todos los componentes de las primeras cervecitas, las segundas y las que nos seguimos tomando... los del 2-5, los del 2-6, los del 2-2 y todos los que hemos ido a disfrutar de la química de los alimentos, con esas conversaciones que a veces se alargan

hasta las tantas de un día cualquiera. Especialmente Nacho, Sergio, Alberto, Pavel, Cal-lo, Nour, Liliana, Paula, Inma, Andrea, Felix, Tatiana... y ,aunque no vienen tanto como me gustaría, Raúl, Luis, Chelo etc.

Recordar también a toda la gente que he conocido en los congresos especialmente Virginia, Antonio, Juan etc. con los que he compartido muy buenos momentos.

A todos mis amigos de Valencia y de Moixent que con esas paellas, cenas, cervecitas y demás le alegran la vida a uno.

Agradecer a mis familiares los consejos recibidos y en concreto a mis tíos Juan José y Manolo Camarasa.

Muy especialmente, agradecer todo el apoyo incondicional y entendimiento recibido a lo largo de toda mi vida por parte de mis padres, mi hermana, mi abuela, mi cuñado y de mi sobrinita Sandra, sin los que nada de esto hubiese sido posible.

Muchas gracias a todos!

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

PARTE I. EL AGUA Y LOS SISTEMAS DE POTABILIZACIÓN	
I.1 Evolución de los tratamientos de potabilización	3
I.2 Sistema convencional de potabilización	4
PARTE II. SUBPRODUCTOS DE LA DESINFECCIÓN. TRIHALOMETANOS	
II.1 Antecedentes	6
II.2 Situación actual de los SPDs	7
II.3 Efectos de los SPDs sobre la salud	8
II.4 Reglamentaciones sobre los SPDs	9
II.5 Tecnologías para limitar la formación de SPDs	10
PARTE III. MATERIA ORGÁNICA DEL AGUA	
III.1 Concentraciones habituales de la MON del agua	12
III.2 Tipos de materia orgánica en aguas naturales	13
III.3 Sustancias no húmicas	14
III.4 Materiales acuáticos húmicos	19
PARTE IV. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE THMs	
IV.1 Formación de THMs a partir de compuestos fenólicos	27
IV.2 Formación de THMs a partir de compuestos β -dicarbonílicos	29
IV.3 Cloración de compuestos nitrogenados	30
IV.4 Variables que afectan a la formación de THMs	31
IV.5 Precursores inorgánicos en la formación de THMs	32
IV.6 Reacciones del cloro con compuestos modelo	34
PARTE V. CONTAMINANTES EMERGENTES EN LAS AGUAS DE ABASTECIMIENTO Y AGUAS POTABLES	
V.1 Compuestos farmacéuticos	41
V.2 Origen de la contaminación química de los recursos acuáticos	43
V.3 Reducción de compuestos farmacéuticos	44
V.4 Contaminantes emergentes y sus SPDs	45
PARTE VI. REACCIÓN DEL ClO_2 CON COMPUESTOS PRESENTES EN LOS RECURSOS ACUÁTICOS	
VI.1 El ClO_2 en el tratamiento de aguas	46
VI.2 Reactividad del ClO_2	47
PARTE VII. ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS RESISTENTES EN EL AGUA POTABLE	
VII.1 Legislación	51
VII.2 Análisis de C.Parvum y G.Lambliia	52
VII.3 Resistencia a los desinfectantes químicos	53
VII.4 Desinfección fotocatalítica	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

CAPÍTULO 2	
OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	67
2.2 Objetivos específicos	67
CAPÍTULO 3	
ANÁLISIS DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA DEL RÍO TURIA. COMBINACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y DE DERIVATIZACIÓN.	
3.1 Introducción	71
3.2 Procedimiento de concentración	72
3.3 Procedimiento de fraccionamiento	73
3.4 Análisis elemental	75
3.5 Estudio espectroscópico	76
3.6 Análisis de compuestos orgánicos por derivatización	81
3.7 Análisis de compuestos orgánicos tras someter las fracciones a hidrólisis y posterior derivatización	85
3.8 Estudio de espectrometría de masas de las fracciones	89
3.9 Análisis de amino ácidos	110
3.10 Conclusiones	112
3.11 Referencias bibliográficas	113
CAPÍTULO 4	
CARBOHIDRATOS COMO PRECURSORES DE TRIHALOMETANOS. INFLUENCIA DEL pH Y DE LA CONCENTRACIÓN DE Br- Y Cl- EN EL POTENCIAL DE TRIHALOMETANOS	
4.1 Introducción	117
4.2 Formación de CHCl_3 a pH 8	119
4.3 Influencia del pH en el PFTHMs	123
4.4 Influencia de la presencia de Cl- en el PFTHMs	127
4.5 Influencia de la presencia de bromuros en el PFTHMs	130
4.6 Conclusiones	142
4.7 Referencias bibliográficas	143
CAPÍTULO 5	
INFLUENCIA DE LOS IONES Ca^{+2} Y Mg^{+2} PRESENTES EN LAS AGUAS DURAS EN LA FORMACIÓN DE TRIHALOMETANOS	
5.1. Introducción	147
5.2 Influencia del Ca^{+2} y Mg^{+2} en la formación de THMs	149
5.3 Conclusiones	158
5.4 Referencias bibliográficas	159

CAPÍTULO 6	
REACCIÓN DEL DIÓXIDO DE CLORO CON ANTIBIÓTICOS COMO CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN DE TRES ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS	
6.1 Introducción	163
6.2 Reacción de antibióticos β -lactámicos con ClO_2	164
6.3 Influencia del pretratamiento con ClO_2 en la formación de THMs durante el proceso de cloración	171
6.4 Conclusiones	173
6.5 Referencias bibliográficas	174
CAPÍTULO 7	
REACCIÓN DEL DIÓXIDO DE CLORO CON TRES AMINO ÁCIDOS REPRESENTATIVOS EN AGUA	
7.1 Introducción	177
7.2 Reacción de amino ácidos con ClO_2	178
7.3 Influencia el pretratamiento con ClO_2 la formación de THMs	189
7.4 Conclusiones	190
7.4 Referencias bibliográficas	191
CAPÍTULO 8	
DESINFECCIÓN FOTOCATALÍTICA DE UN AGUA CONTAMINADA CON CRIPTOSPORIDIUM PARVUM Y GIARDIA LAMBLIA EMPLEANDO UN FOTOCATALIZADOR CERÁMICO DE FIBRAS DE TiO_2	
8.1 Introducción	195
8.2 Desinfección fotocatalítica de C.Parvum y G.Lambliia	197
8.3 Conclusiones	200
8.4 Referencias bibliográficas	201
CAPÍTULO 9	
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
9.1 Materiales	205
9.2 Procedimientos de limpieza de materiales y equipos	210
9.3 Concentración y extracción de la materia orgánica del río Turia	211
9.4 Reacción de compuestos modelo con Cl_2 y ClO_2	213
9.5 Experimentos de desinfección	237
9.6 Instrumentación y métodos analíticos empleados	238
9.7 Referencias bibliográficas	245
CONCLUSIONES	249
CONCLUSIONS	252
RESÚMEN	257
RESUM	260
ABSTRACT	263
ESTANCIAS EN EL EXTRANJERO, CONGRESOS Y PUBLICACIONES	267
ANEXO I. RECOPIACIÓN DE ARTÍCULOS	271

Capítulo 1

Introducción

PARTE I. EL AGUA Y LOS SISTEMAS DE POTABILIZACIÓN

El agua es uno de los recursos básicos para el desarrollo económico y social de cualquier civilización. Debido a la disponibilidad limitada de este recurso y al impacto que la actividad humana tiene sobre su composición existe un gran interés a nivel social y sanitario sobre todos los aspectos relacionados con la calidad del agua. Su estructura química presenta propiedades especiales que determinan que el agua sea un excelente disolvente de sustancias polares (orgánicas e inorgánicas), por lo que es tremendamente difícil encontrarla en la naturaleza como sustancia pura. Los compuestos presentes en el agua se originan debido al arrastre y disolución de los minerales que componen los lechos por los que discurren las aguas superficiales o a las escorrentías y filtraciones que recibe a lo largo de su cuenca.

Además, hoy en día se sabe que el agua es una de las principales vías de transmisión de bacterias, virus y protozoos a los animales y al hombre. Este hecho ha provocado que su ingesta sin tratamiento alguno o con tratamiento deficiente haya provocado a lo largo de la historia grandes epidemias a la humanidad causando la muerte de millones de personas así como múltiples enfermedades como diarrea, cólera, disentería y fiebre tifoidea entre otras.

I.1 Evolución de los tratamientos de potabilización

Desde la antigüedad los sistemas de potabilización se basaban en obtener un agua clara y limpia ¹. A principios de 1700, se comenzó a emplear sistemas de filtración como medio efectivo para la eliminación de partículas del agua. A mediados de 1800 se desarrolló el sistema denominado filtración lenta sobre arena y empezó a emplearse de modo regular en Europa, y a mediados de 1870 en Estados Unidos. El desarrollo científico en bacteriología en estos años demostró que la filtración lenta sobre arena además de la eliminación de la turbidez del agua también conseguía eliminar microorganismos patógenos causantes de fiebre tifoidea, disentería y cólera. A partir de este momento es cuando los

sistemas de filtración empezaron a entenderse como un sistema de potabilización. A finales de 1890, se desarrollaron los denominados sistemas de filtración rápida, los cuales combinaban la coagulación con una filtración rápida sobre arena, permitiendo que se pudieran tratar mayores volúmenes de agua. No fue hasta 1908, en la ciudad de Nueva Jersey en los EEUU, cuando se aplicó por primera vez hipoclorito sódico como agente primario de desinfección. En 1914 el Servicio de Salud Pública de los EEUU redactó la primera reglamentación referida al agua, recomendando el uso del cloro para el control de especies patógenas que pudiesen estar presentes en los sistemas de suministro de agua potable.

Los buenos resultados obtenidos desde el punto de vista bacteriológico determinó que la introducción del cloro en los sistemas de potabilización se convirtiese en uno de los mayores logros del siglo XX en cuanto a salud pública se refiere ².

I.2 Sistema convencional de potabilización

En la actualidad, el sistema de tratamiento convencional para obtener un agua potable se representa en la Figura 1.1. Básicamente dicho tratamiento consiste en una desinfección/preoxidación del agua natural a la entrada de la planta, seguida de un proceso físico-químico (p.ej. coagulación/floculación), una filtración sobre arena y una desinfección final antes de introducir el agua en la red de suministro. En España, por ley (RD 140/2003) la desinfección secundaria debe realizarse con cloro y mantenerse unos niveles de 1 mg L^{-1} a lo largo del sistema de distribución de agua.

En cualquier caso el tratamiento aplicado debe garantizar una serie de parámetros microbiológicos y físico-químicos que hagan del agua potable apta para su consumo. España, al igual que los demás países europeos, traspuso la Directiva Europea 98/83/CE a la legislación española a través del Real Decreto 140/2003. Dicho Real Decreto establece los criterios sanitarios aplicables a la calidad del agua de consumo humano.

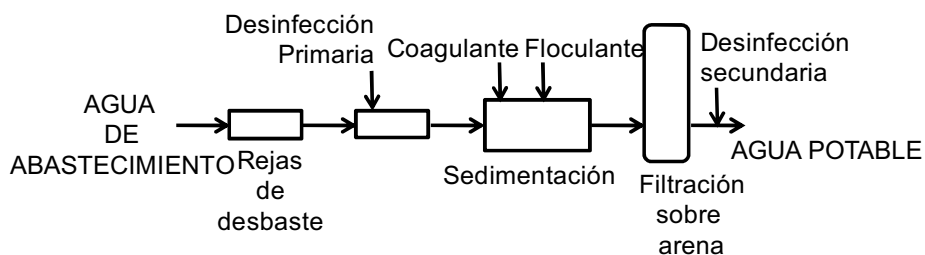


Figura 1.1. Proceso convencional de tratamiento para aguas potables

Episodios importantes de enfermedades transmitidas a través del agua potable que han ocurrido recientemente tales como el brote de cólera ocurrido en Perú en 1991, la cryptosporidiosis ocurrida en 1993 en la ciudad de Milwaukee (Wisconsin, EEUU) o la gastroenteritis inducida en el año 2000 en Walkerton, (Ontario, Canadá)³, han servido de recordatorio dramático de la necesidad de la desinfección para controlar los agentes patógenos presentes en el agua. Además, la constante evolución de la Sociedad y los niveles de calidad que exige han hecho necesario una reevaluación continua de las técnicas de desinfección para garantizar la desinfección lo más completa y eficaz posible del agua potable.

PARTE II. SUBPRODUCTOS DE LA DESINFECCIÓN. LOS TRIHALOMETANOS

La necesidad de aplicar al agua una desinfección química persistente origina como efecto secundario la formación de subproductos de la desinfección (SPDs) los cuales pueden llegar a plantear una cuestión de salud pública debido a los efectos potencialmente cancerígenos y negativos para la salud asociados con ellos.

El cloro y los desinfectantes químicos son efectivos en mayor o menor medida para matar los microorganismos nocivos presentes en el agua potable, pero también pueden oxidar y/o halogenar la materia orgánica natural presente en el agua, los posibles contaminantes antropogénicos, y aniones como el bromuro y el yoduro presentes en la mayor parte de los recursos acuáticos naturales. Actualmente se sabe que cualquier desinfectante empleado produce en el agua potable su propia colección de SPDs, además de los productos que pueden surgir de la combinación de dichos desinfectantes⁴. Esta es la razón por la cual la mayoría de los países más desarrollados han publicado normas o directrices para el control de los SPDs y minimizar así la exposición de los consumidores a sustancias químicas potencialmente peligrosas manteniendo al mismo tiempo una desinfección adecuada y el máximo control posible de agentes patógenos.

II.1 Antecedentes

La historia de los SPDs comenzó en 1974 cuando primero Rook⁵ en los sistemas de distribución de agua potable de la ciudad de Amsterdam (Holanda) y un poco más tarde, y de manera independiente, Bellar⁶ en la ciudad de Nueva Orleans (EEUU) detectaron la presencia de trihalometanos (THMs) en aguas de abastecimiento que habían sido cloradas. Estos estudios establecieron que los THMs eran los productos resultantes de la reacción del cloro añadido como desinfectante con la materia orgánica presente en el agua. Los THMs pueden contener átomos de bromo los cuales se incorporan por la reacción de la materia orgánica con el bromo, formado en la de oxidación del bromuro (presente en las aguas naturales) con el cloro añadido como desinfectante. Actualmente incluso se están

detectando THMs yodados debido a la presencia, generalmente a nivel traza, de iones yoduro que reaccionan con el cloro para dar lugar al ácido hipoyodoso.

II.2 Situación actual de los SPDs

Desde que se detectaron los THMs se han realizado estudios para comprender su formación y los efectos sobre la salud ^{3,4,7-15} de estos y otros SPDs. Actualmente en la literatura se pueden encontrar más de 600 SPDs ^{4,16,17} que se detectan cuando se emplean como desinfectante algunos de los siguientes reactivos: cloro, cloraminas, dióxido de cloro, ozono e incluso el ácido peracético ¹⁸ plata-peróxido de hidrógeno ¹⁹ y UV-dióxido de titanio ²⁰. No obstante únicamente un bajo porcentaje de estos SPDs han sido detectados en aguas potabilizadas a escala industrial. Además poco o nada se conoce de la incidencia de muchos de estos SPDs sobre la salud humana.

La Figura 1.2 muestra la estructura y la distribución más común de algunos SPDs halogenados detectados tras la aplicar un tratamiento convencional de potabilización. A partir de dicha distribución se observa que los THMs seguidos de los ácidos haloacéticos (HAAs) son los dos grupos cuantitativamente más importantes representando un 20 y un 10% del carbono orgánico halogenado (TOX), respectivamente ²¹. Los THMs (4 compuestos) y los HAAs (5 compuestos) son los que están actualmente regulados en diferentes países, aunque con diferentes contenidos máximos según la reglamentación específica de cada país. Además, otros compuestos como los haloacetonitrilos, haloácidos, haloamidas, halocetonas, hidrato de cloral, furanonas halogenadas, cloruro de cianógeno, nitrosaminas, halocetonas, halonitrometanos están siendo detectados en diferentes aguas potables ^{3,4,7,21-25}.

Los SPDs que han sido cuantificados en las aguas potables están presentes por lo general en niveles de $\text{sub-}\mu\text{g L}^{-1}$ ó entre niveles medios-bajos- $\mu\text{g L}^{-1}$. Además cabe destacar que más del 50% TOX no ha sido contabilizado como SPDs ²⁶.

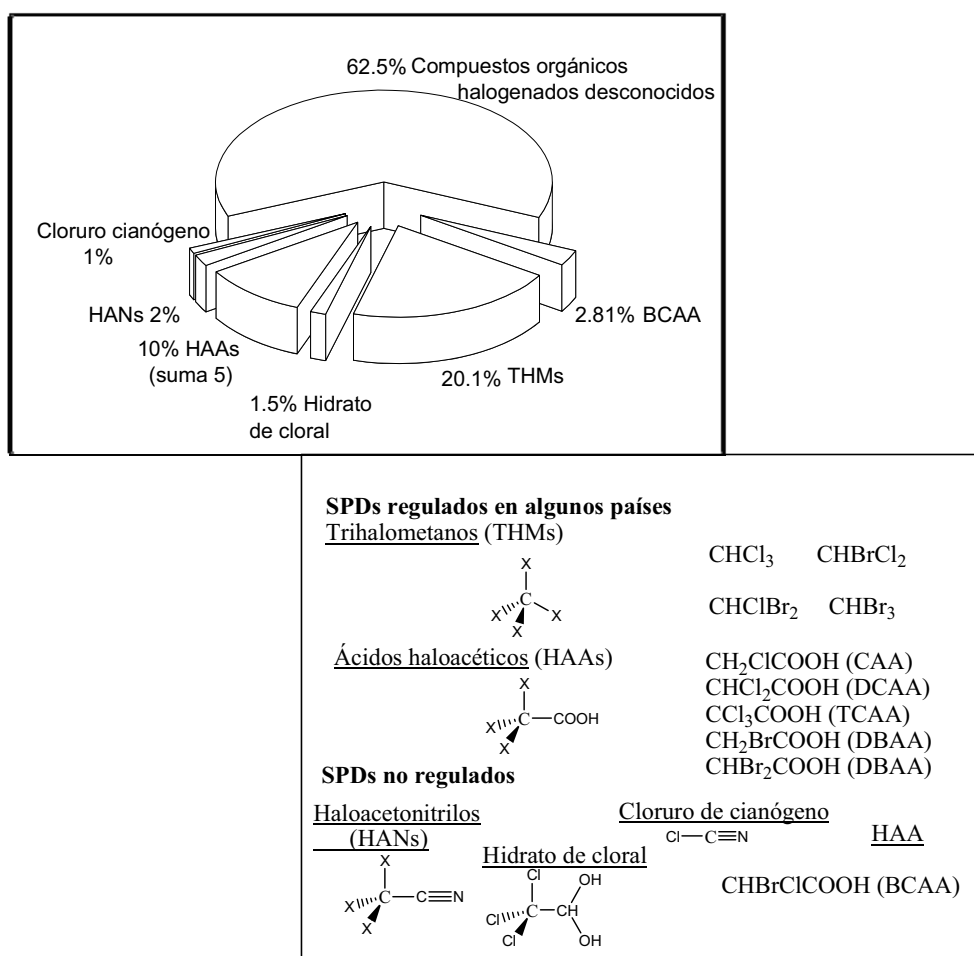


Figura 1.2. Distribución de SPDs originados en la cloración

II.3 Efectos de los SPDs sobre la salud

Desde la detección de los primeros SPDs en 1974 se han llevado a cabo numerosas investigaciones para determinar los posibles efectos de la ingesta continuada de THMs sobre la salud. Principalmente los estudios en humanos y animales se han centrado en conocer si estos compuestos son cancerígenos y/o mutagénicos. En 1976 la Agencia de Protección Ambiental en los Estados Unidos (US EPA) publicó unos resultados mostrando que los THMs eran ubicuos en aguas potables cloradas ²⁷. En el mismo año el Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU publicó unos resultados sobre la ingesta de cloroformo

(CHCl₃) y el desarrollo de cáncer en animales ²⁸. Además, los primeros informes aparecidos en la década de los años 1970 mostraron que extractos orgánicos del agua potable eran mutagénicos en los ensayos bacterianos de Salmonella ²⁹.

Estudios epidemiológicos han demostrado que una exposición al agua clorada a lo largo de la vida está asociada con un aumento del riesgo de cáncer ^{15,30-32}, especialmente cáncer de vejiga urinaria y de colon. Por otra parte también existen indicios sobre los efectos en humanos de los SPDs sobre la capacidad reproductiva y de desarrollo del feto en factores tales como el bajo peso al nacer, retraso de crecimiento intrauterino y aborto espontáneo ^{7,33-47}.

En la actualidad los SPDs bromados están siendo reconocidos como toxicológicamente importantes, al ser muchos de ellos más carcinogénicos que los análogos clorados ^{12,13,48}. Además de los bromados, estudios preliminares apuntan a que los compuestos yodados pueden ser más tóxicos incluso que los correspondientes bromados ^{49,50}.

Actualmente está demostrado que la exposición a los THMs, además de a través de la ingestión ⁵¹, también tiene lugar de manera significativa a través de la inhalación y por la absorción dérmica ^{49,52-57}. Así pues, por ejemplo, se ha demostrado ⁵³ que una persona puede recibir el doble de exposición a los THMs a través de una ducha debido a la inhalación y una exposición equivalente a través de adsorción dérmica (p.ej. un baño) comparado con la ingesta de 2 L de agua ^{54,58,59}.

II.4 Reglamentaciones sobre los SPDs

Las observaciones anteriores han provocado que las administraciones públicas hayan considerado a los SPDs un problema de salud pública. Consecuentemente han establecido límites máximos de SPDs mediante reglamentaciones referidas a la calidad del agua potable. Los EEUU en 1979 fueron pioneros en fijar un nivel máximo de THMs de 100 µg L⁻¹ ⁶⁰. En 1998 una nueva norma, que entró en vigor en enero de 2002, rebajó el límite

de los THMs hasta los $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁶¹; además de regular por primera vez los ácidos haloacéticos (HAAs) fijando un límite máximo de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ a la suma de cinco de ellos (ácido bromoacético, ácido dibromoacético, ácido cloroacético, ácido dicloroacético (DCAA) y el ácido tricloroacético (TCAA)). En 1979 Canadá fijó el límite máximo de THMs en $350 \mu\text{g L}^{-1}$ y lo rebajó en 1993 hasta $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

En Europa, no fue hasta 1998 cuando una Directiva Europea fijó un valor máximo de THMs de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁶². Esta directiva fue traspuesta en España a través del Real Decreto 140/2003 ⁶³, y es efectiva desde enero de 2009. En el período transitorio se permitió un valor máximo de THMs de $150 \mu\text{g L}^{-1}$. No obstante no hay reglamentación alguna sobre los HAAs.

A parte de los valores máximos fijados por diferentes países la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera unos valores guía para los límites máximos de THMs: $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para CHCl_3 , $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para CHBrCl_2 , $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para CHClBr_2 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para CHBr_3 . Respecto a los HAAs la OMS recomienda unos valores guía máximos de 50 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para DCAA y TCAA, respectivamente.

II.5 Tecnologías para limitar la formación de SPDs

Debido a los límites cada vez más estrictos respecto a los valores máximos de los SPDs, principalmente THMs y HAAs, muchas plantas de tratamiento de aguas potables han tenido que modificar sus prácticas de desinfección y/o potabilización para reducir la formación de SPDs ²¹. En la práctica las acciones se pueden dividir en 1) eliminación de los precursores orgánicos ⁶⁴ (p.ej. coagulación, adsorción en carbón activo, membranas de filtración) o inorgánicos ⁶⁵ (p.ej. eliminación electroquímica de bromuro) ; 2) uso de desinfectantes alternativos al cloro (p.ej. uso de O_3 ó ClO_2 en desinfección primaria; además de reducir THMs y HAAs estos reactivos son desinfectantes más efectivos que el Cl_2) ó 3) eliminación de los SPDs (p.ej. adsorción en carbón activo, zeolitas ó empleo de membranas).

Diferencias en las condiciones de las fuentes de abastecimiento de agua, (p.ej. concentración de bromuro, de yoduro, de MON ó el pH) y en el tipo ó tipos de desinfectantes empleados pueden tener un efecto dramático en los niveles y características (p. ej. distribución de átomos de cloro, bromo y/o yodo) de los SPDs formados ^{3,8,22,60}.

Parte III. MATERIA ORGÁNICA DEL AGUA

Una cuestión relevante en la formación de SPDs es conocer cuáles son los precursores que dan lugar a estos compuestos. Para resolver esta cuestión es necesario determinar la composición orgánica de las aguas de abastecimiento.

Los compuestos orgánicos están presentes en todas las aguas naturales ⁶⁶. El término comúnmente empleado para describir la mezcla compleja de compuestos orgánicos presentes de manera natural en los recursos acuáticos es el de materia orgánica natural (MON) del agua. En general la MON del agua no se considera nociva para la salud aunque puede actuar adsorbiendo o facilitando la disolución de diversos contaminantes poco solubles en agua pura ⁶⁷ y además pueden complejar metales pesados ⁶⁸. Con todo, los principales problemas de la MON derivan de su interacción con los agentes desinfectantes empleados dando lugar a un gran abanico de SPDs ^{17,61}.

En última instancia la resolución de la estructura de los compuestos orgánicos presentes en el agua y el conocimiento de su interacción con los desinfectantes que generan subproductos no deseados podría permitir diseñar tratamientos de aguas selectivos para evitar o minimizar estos subproductos. Actualmente, los sistemas de tratamiento de aguas potables están basados en la aplicación de procedimientos que no tienen en cuenta la composición y las características de la materia orgánica del agua (p.ej. coagulación, floculación, carbón activo y sistemas de membranas).

III.1 Concentraciones habituales de la MON del agua

El origen de la MON tanto en aguas dulces como en aguas saladas cercanas a la costa proviene sobre todo del arrastre de la materia orgánica de los suelos. El parámetro analítico más comúnmente empleado para determinar la MON del agua es el contenido en carbono orgánico total (COT); generalmente se expresa en mg L⁻¹. El COT se puede dividir en carbono orgánico disuelto (COD) y particulado (COP) ⁶⁹⁻⁷¹. Se considera COP al carbono orgánico que pasa a través de un filtro de 1.2 µm y se retiene en uno de 0.45 µm. El COD

es el carbono orgánico que pasa a través de un filtro de 0.45 μm . El COP está formado principalmente bacterias, virus, fitoplancton, zooplancton y minerales con revestimiento orgánico. El COD suele incluir moléculas orgánicas y macromoléculas tales como las sustancias húmicas, ligninas, taninos, carbohidratos, proteínas y otras biomoléculas. En general el COP suele ser un 10% del DOC y aproximadamente representa entre un 2-3% de los sólidos suspendidos en un agua natural.

La concentración de COD suele variar dependiendo de la fuente ⁶⁶. Entre las aguas superficiales, las aguas marinas contienen las menores concentraciones de COD y oscilan alrededor de 0.5-1 mg L^{-1} . Por otro lado, las aguas dulces contienen cantidades más altas y variables con una medias en el rango de 2-6 mg L^{-1} , pudiendo llegar en muchos casos a 10 mg L^{-1} o incluso a 30 mg L^{-1} .

III.2 Tipos de materia orgánica en aguas naturales

La composición de la MON es extremadamente diversa e incluso algunos investigadores han afirmado que en el mejor de los casos sólo somos capaces de identificar el 20% del COD ⁶⁶. No obstante, siempre es posible clasificar este material en función de sus propiedades físico-químicas o de su similitud estructural. De manera general, en la MON de un agua se puede diferenciar aquella representada por compuestos orgánicos (ver Figura 1.3) con una estructura totalmente definida (*sustancias no-húmicas*) de aquella cuya estructura química es parcialmente desconocida y que comúnmente se denominan como *sustancias húmicas* (ver apartado 3.3.2) ⁷⁰⁻⁷¹.

MATERIA ORGÁNICA NATURAL (MON) DEL AGUA

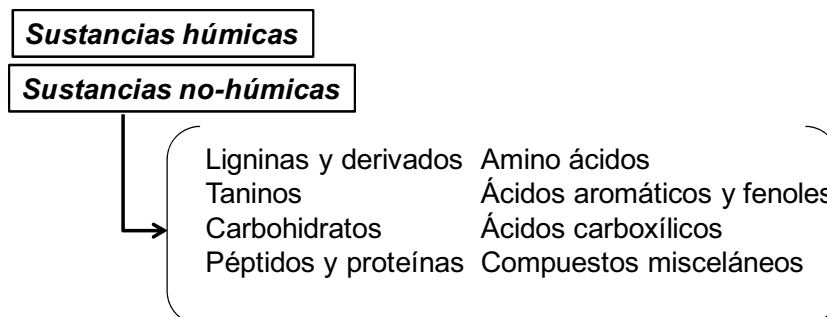


Figura 1.3. Constituyentes generales de la material orgánica natural del agua

III.3 Sustancias no húmicas

Las sustancias no húmicas, o compuestos orgánicos con estructura definida, son los precursores de las sustancias húmicas y son la principal fuente de energía metabólica de los microbios del suelo ⁷⁰. Los principales grupos que las componen son: carbohidratos (mono-, oligo- y polisacáridos), compuestos nitrogenados (amino ácidos, proteínas, ácidos nucleicos y amino azúcares), lípidos (grasas, ceras, resinas, esteroides y terpenos) y lignina. Estas moléculas "no-húmicas" junto con sus productos de degradación son las unidades básicas que conforman los bloques de las sustancias húmicas.

Se ha propuesto la separación de dichos componentes mediante métodos basados en la adsorción de los componentes sobre diferentes tipos materiales (ver apartado III.4).

A continuación se describen los principales grupos de estos compuestos que en mayor o menor medida han sido analizados en diferentes recursos naturales acuáticos ^{66,70-}

⁷².

Carbohidratos

La mayor parte de compuestos orgánicos disueltos identificables en la MON de las aguas dulces y de los suelos se compone de hidratos de carbono, y procede principalmente de los tejidos vegetales y en menor medida de la actividad microbiana^{70,73}. Las formas poliméricas (principalmente celulosa, almidón y hemicelulosas) son predominantes sobre los di- o monosacáridos debido a que son más difícilmente asimilables como nutrientes por parte de los microorganismos acuáticos (fitoplancton) o del suelo. La transformación de los monosacáridos por parte de los microorganismos da lugar a CO₂, a otros carbohidratos o se combinan con otros productos microbianos como amino ácidos ó lípidos⁷³. Entre las formas monoméricas derivadas de origen vegetal o microbiano destaca la glucosa y en menor medida galactosa y manosa. Respecto a las monoméricas derivadas de la actividad microbiana destacan las desoxihexosas (ramnosa y fucosa) y las hexosaminas (principalmente la glucosamina), mientras que las pentosas (principalmente arabinosa y xilosa) derivan principalmente de origen vegetal.

Taninos

Los taninos son productos derivados de las plantas y suelen ser, después de los carbohidratos, el segundo grupo de compuestos orgánicos en porcentaje en los suelos. Se clasifican comúnmente en base a su vía de biosíntesis y sus propiedades químicas: taninos condensados ó taninos hidrolizables (ver Figura 1.4)⁷⁴.

Los taninos condensados son polímeros de procianidina (un flavonoide) y/o prodelfinidina unidos a través de los carbonos C4-C8 y a veces a través de enlaces C4-C6 (ver Figura 1.4). Los taninos hidrolizables consisten en una unidad de azúcar, generalmente glucosa, sobre el que están esterificados unidades del ácido gálico, elágico ó floroglucinol. Poco se sabe de las concentraciones de estos compuestos en la MON del agua, sin embargo algunas suposiciones los situarían en torno a 1% del COD.

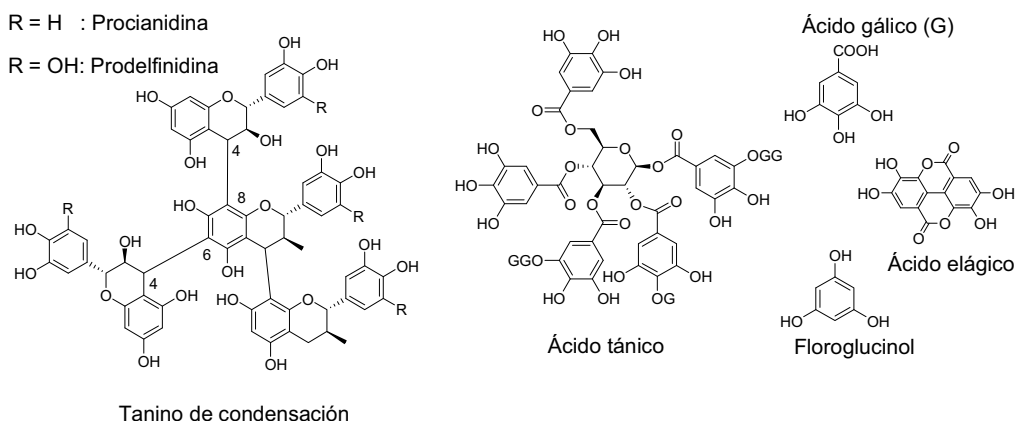


Figura 1.4. Posibles estructuras moleculares de un oligómero de tanino condensado y de tanino hidrolizable (ácido tánico).

Ligninas

La importancia de las ligninas radica en que están consideradas en varias teorías de la génesis de sustancias húmicas como la principal fuente de MON de las aguas naturales. Se definen como complejos biopolímeros de elevado peso molecular, altamente aromáticos, formados principalmente por unidades de fenil propanoide unidos a través de enlaces de tipo carbono-carbono y éter^{75,76}. Los derivados fenilpropanoides principales son los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico⁷⁵ (ver Figura 1.5). La degradación de la lignina la llevan a cabo principalmente los hongos y eventualmente algunas bacterias acuáticas ó terrestres⁷⁶⁻⁷⁸. La degradación más común de la lignina incluye una depolimerización, demetilación, oxidación de la cadena lateral y ruptura del anillo aromático tal y como se muestra en la Figura 1.5. Algunos estudios sobre la MOD de algunas aguas de abastecimiento han encontrado que la lignina o derivados de la misma son la principal fuente de MON (p.ej. río Suwannee)⁷⁹⁻⁸¹.

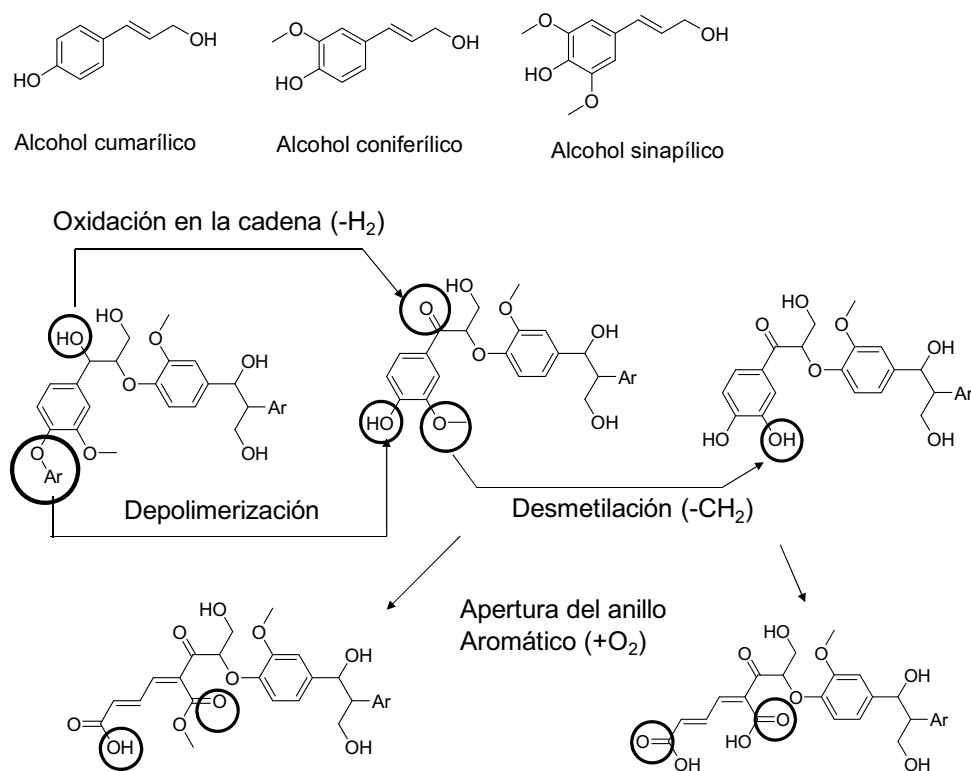


Figura 1.5. Principales componentes de la lignina y representación de un camino de biodegradación

Ácidos aromáticos y fenoles

Respecto a los ácidos aromáticos y fenoles, éstos pueden llegar a representar alrededor del 0.5% del COD. Se supone que estos compuestos son productos de degradación de la lignina y de los taninos. De hecho, algunos de los ácidos aromáticos identificados se asemejan a los monómeros de la lignina ⁶⁶.

Compuestos nitrogenados. Amino ácidos y proteínas

La presencia de compuestos orgánicos nitrogenados en aguas de abastecimiento y en aguas tratadas es objeto de preocupación debido a que pueden aumentar drásticamente el consumo de cloro ⁸².

Ha sido reconocido durante mucho tiempo que las unidades de amino ácidos condensados (en proteínas, peptidos, y o enlazados a las sustancias húmicas) constituyen el origen principal del nitrógeno acuático, pudiendo llegar a representar estos compuestos entre 1-3% del COD en aguas superficiales cuando éstas están en presencia de algas. La concentración de amino ácidos totales disueltos en aguas superficiales generalmente varía alrededor de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Algunos investigadores incluso han detectado $3000 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁸³ en lagos durante períodos de floración de algas. En las aguas naturales ^(71,85) y en algunas las algas ⁽⁸⁶⁾ se ha identificado al ácido aspártico como el amino ácido mayoritario.

Compuestos carbonílicos, ácidos carboxílicos y ésteres

Compuestos carbonílicos, ácidos carboxílicos y ésteres de una amplia variedad de estructuras han sido aislados de aguas superficiales. Los ácidos de bajo peso molecular suelen provenir de la degradación microbiana de la MON dando lugar a mono-, di- y tricarboxílicos (p.ej. fórmico, acético, láctico, glicólico, málico, succínico, butanoico, pentanoico, hexanoico y cítrico) ⁷⁰. Los ácidos de elevado peso molecular (principalmente palmítico y esteárico) provienen de la hidrólisis de los lípidos provenientes de las algas y de las plantas terrestres.

Entre estos compuestos posee una importancia particular el ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) como modelo de la materia orgánica natural. Estudios con agua modelo han evaluado la influencia del ácido cítrico en la calidad del agua y su habilidad de actuar como precursor de SPDs, especialmente de THMs y HAAs. El ácido cítrico es un ingrediente de frutas, hortalizas, semillas y flores. Interviene en el ciclo de Krebs y se produce en los fluidos del cuerpo humano (sangre, orina, etc.) Se utiliza en champús, limpiadores del hogar, detergentes, como un aditivo alimentario y en muchas otras industrias. Debido a su importancia en la bioquímica natural y en las actividades industriales, se ha considerado al ácido cítrico como un compuesto omnipresente en el suministro de agua. Algunas investigaciones han revelado su presencia en aguas potables,

en aguas naturales y en efluentes de aguas residuales en concentraciones de hasta 10 mg L⁻¹ ⁸⁷.

Compuestos misceláneos

Entre estos compuestos destacan algunos subproductos volátiles y semivolátiles, procedentes de algas verdes-azules ó de actinobacterias (ó actinomycetes) que son los responsables de muchos de los olores y sabores en las aguas potables. Los más conocidos son la Geosmina (trans-1,10-dimethyl-trans-9-decalol) y el 2-metil isoborneol (MIB, 1,6,7,7-tetrametilbicyclo(2,2,1)heptan-6-ol) a los cuales les han sido atribuídos olores a tierra mohosa (Figura 1.6). A pesar de encontrarse en concentraciones en el rango de ng L⁻¹ la presencia de los mismos pueden hacer necesario tratamientos adicionales encaminados a eliminar su impacto en las propiedades organolépticas de un agua.

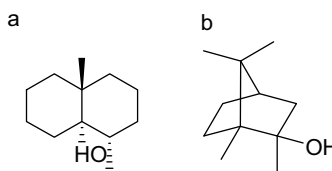


Figura 1.6. Estructuras de la geosmina (a) y el 2-metil-isoborneol (b).

III.4 Materiales acuáticos húmicos

Las sustancias húmicas están consideradas como los componentes mayoritarios de la materia orgánica en los sistemas naturales terrestres y acuáticos. En las aguas naturales algunas estimaciones indican que representan entre un 30-50% del COD ⁸⁸ y su origen es principalmente terrestre. La estructura de las sustancias húmicas es imprecisa puesto que no corresponden a una única familia de compuestos sino que están formadas por una mezcla muy complicada y heterogénea de sustancias orgánicas ^{66,89}. A pesar de haber sido posible un fraccionamiento parcial de estas sustancias en base a sus características químicas y tamaño molecular, las fracciones más homogéneas obtenidas continúan siendo sistemas muy heterogéneos.

Definiciones

En la literatura específica de la química del suelo y del agua pueden encontrarse varias definiciones de las sustancias húmicas^{70,73,90,91}. En general, las sustancias húmicas se han definido como polímeros heterogéneos polifuncionales formados a partir de restos de organismos vegetales y animales tras una serie de procesos químicos y biológicos^{70,71}. Más concretamente las principales reacciones metabólicas que tienen lugar son de oxidación y de condensación entre polifenoles, polisacáridos y poliamino ácidos de origen vegetal y microbiano, que tienen lugar durante el proceso de humificación. Tras dicho proceso el arrastre de dichas sustancias generadas en el suelo por parte del agua origina la mayor parte de la MON del agua.

La definición más aceptada en la literatura para los materiales húmicos⁷¹, es la propuesta por Aiken que los definió de la siguiente manera: “*Las sustancias húmicas son una categoría de sustancias orgánicas naturales y heterogéneas de elevado peso molecular que pueden ser aisladas del medio ambiente y definidas operacionalmente en términos de su solubilidad diferenciando: huminas, ácidos húmicos y fúlvicos*”. Las huminas es la fracción de las sustancias húmicas insoluble en agua en cualquier pH. Los ácidos húmicos consisten en la fracción de las sustancias húmicas que precipita en disolución acuosa cuando el pH disminuye por debajo del 2. Los ácidos fúlvicos consisten en fracción de sustancias húmicas que es soluble a cualquier pH.

Extracción las sustancias húmicas del agua

El método recomendado por la *Sociedad Internacional de las Sustancias Húmicas* para la separación de las sustancias húmicas se basa en el empleo de resinas de adsorción XAD8 ó DAX8^{92,93}. La necesidad de tener que procesar grandes volúmenes de agua (p.ej. 1.000 L de agua con COD 1 mg L⁻¹ con una recuperación del 100% daría lugar a 1 g L⁻¹ de materia orgánica), hace conveniente emplear una etapa de concentración mediante membranas (p.ej. ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa). Se prefiere el uso de

membranas debido a que este método es relativamente rápido comparado con las demás técnicas y no expone a la muestra a condiciones drásticas con lo que tras su concentración la materia orgánica permanece en su concentrado en su estado original⁹⁴⁻⁹⁷.

Evolución de los modelos para los ácidos fúlvicos

La Figura 1.7, muestra los modelos propuestos a lo largo de los años para algunas subfracciones los ácidos fúlvicos del río Suwannee⁹⁸. El primer modelo⁹⁹ está basado en la cuantificación de los grupos funcionales de oxígeno, en datos estructurales de carbono y en medidas de pesos moleculares. Este modelo revela que los ácidos fúlvicos son ricos en estructuras cíclicas, aromáticas y alifáticas, y que tiene una media de 4 grupos carboxílicos por molécula. El segundo modelo¹⁰⁰ derivó de la caracterización cuantitativa de las fracciones resultantes de un fraccionamiento doble en gel de sílice en fase normal. Este modelo revela la fuerza ácida de los ácidos fúlvicos con valores de pK_a de 2 resultantes de grupos carboxílicos agrupados junto con enlaces alifáticos C-O en éteres y ésteres. El tercer modelo¹⁰¹ se diferencia respecto a los primeros modelos por tener un mayor peso molecular, presencia de fenol y de grupos carboxílicos. Este modelo fue el primero diseñado con una posible estructura precursora, puesto que el anillo aromático con metra-hidroxibenceno está presente también en los taninos condensados. El cuarto modelo⁸¹ deriva de la información de la técnica de ionización por electroespray acoplada a un espectrómetro de masas (ESI-MS) en modo negativo. Estos modelos sugieren que los ácidos fúlvicos derivan de la lignina por el producto final 109 m/z indicativo del o-dihidroxibenceno. El quinto modelo¹⁰² también deriva de una subfracción proveniente de elución en gradiente de pH seguido por fraccionamiento en gel de sílice. Esta fracción fue excepcionalmente ácida ($pK_a = 0.5$) y estaba compuesta de estructuras alifáticas con una media de 5 grupos carboxilos por molécula. La fuerte acidez se atribuyó a los efectos de los campos electrostáticos producidos en la agregación de los grupos carboxílicos en el anillo de tetrahidrofurano. Además se propuso la génesis de este producto como derivado de la

lignina. El sexto modelo ¹⁰³ proviene de un fraccionamiento con gel de sílice en fase normal seguido del fraccionamiento en la resina XAD-8. La caracterización se realizó por IR-TF, RMN-¹³C y ESI-MS y se concluyó que las fracciones derivaban principalmente de taninos y terpenoides y en menor medida derivados de precursores de la lignina.

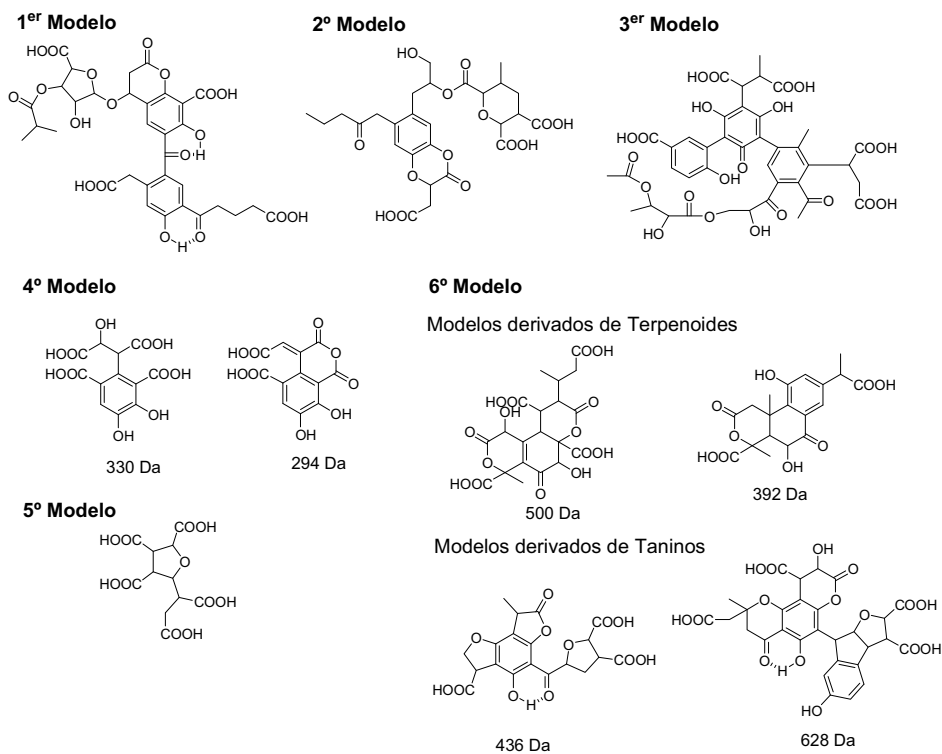


Figura 1.7. Modelos de ácidos fúlvicos extraídos del río Suwannee

Tal y como se ha presentado anteriormente, la evolución de los modelos propuestos depende de la aplicación del mayor número de técnicas disponibles para obtener una caracterización más completa de las sustancias húmicas. Algunos de estos modelos involucran la lignina o taninos como principales precursores de la MON mientras que otros han propuesto que los terpenoides podrían ser los principales precursores ¹⁰⁴.

Propiedades físico-químicas de las sustancias húmicas

A continuación se presentan las principales propiedades físico-químicas de los ácidos fúlvicos, húmicos y huminas (Figura 1.8).

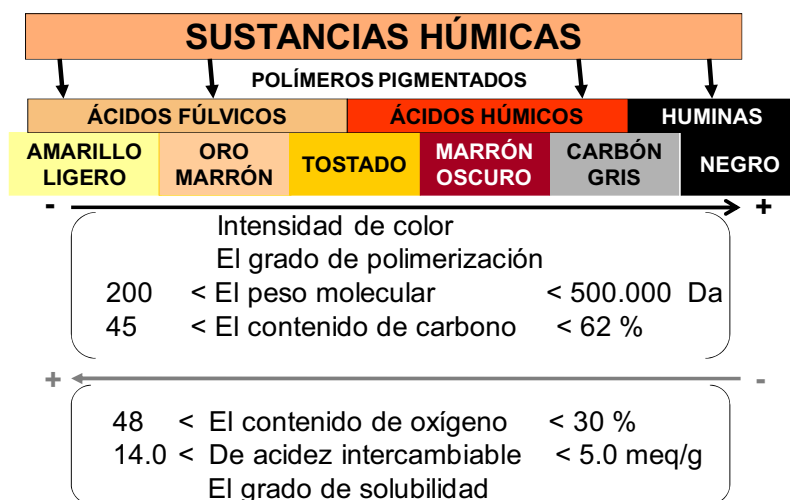


Figura 1.8. Propiedades químicas de las sustancias húmicas

Una característica de las sustancias húmicas es que introducen coloración en el agua debido a la absorción en la región del visible de estas sustancias. En la Figura 1.8 se indica la variación en la apariencia visual de las sustancias húmicas en función de su grado de polimerización y su naturaleza. Los ácidos fúlvicos son las sustancias húmicas con menor grado de polimerización, menor peso molecular, mayor contenido de oxígeno y menor de carbono (ver Tabla 1.1). Además otra diferencia importante es que el oxígeno en los ácidos fúlvicos se encuentra mayoritariamente formando grupos funcionales de naturaleza ácida (-COOH, ArOH) mientras que en los ácidos húmicos el oxígeno actúa como un componente estructural (éter); en consecuencia los ácidos fúlvicos, por lo general, tienen una mayor acidez y pueden ser adsorbidos en resinas de intercambio aniónico ⁹⁵. El contenido de nitrógeno suele ser mayor en los ácidos húmicos oscilando alrededor del 1.6%. El contenido de nitrógeno puede aumentar hasta un 6.5% en el caso de las

sustancias húmicas de origen marino. Generalmente el nitrógeno se le considera mayoritariamente formando enlaces tipo amida (p.ej. péptidos y proteínas).

Tabla 1.1. Composición elemental y razón molar de los ácidos fúlvicos y húmicos del río Suwannee.

	Composición elemental (% peso)				Razón molar		
	C	H	N	S	H/C	N/C	O/C
Ácidos Fúlvicos	46.00	4.11	0.59	0.22	1.07	0.011	0.80
Ácidos Húmicos	50.58	4.50	1.62	0.28	1.07	0.027	0.64

La caracterización del peso molecular de las sustancias húmicas ha sido y todavía es a día de hoy un tema de controversia ^{24,105}. Investigaciones previas empleando cromatografía de permeación de gel indicaron que los ácidos fúlvicos generalmente tenían pesos moleculares entre 200 - 2.000 Da, mientras que en el caso de los ácidos húmicos eran entre 1.000 - 100.000 Da) ^{24,105}. Sin embargo, el empleo de técnicas como ESI- y de ionización química a presión atmosférica (APCI) acopladas a un espectrómetro de masas (MS) está mostrando distribuciones de pesos moleculares alrededor de 800 Da (ver Figura 1.9) para los ácidos fúlvicos y entre 300 - 1.200 Da ²⁴ para los ácidos húmicos. Se está sugiriendo que las diferencias entre los pesos moleculares observados hace unos años y los observados ahora podrían ser debidas a que las sustancias húmicas están en realidad formadas por agregados o estructuras tipo micelas de bajo peso molecular en vez de ser macromoléculas enlazadas covalentemente ^{106,107}.

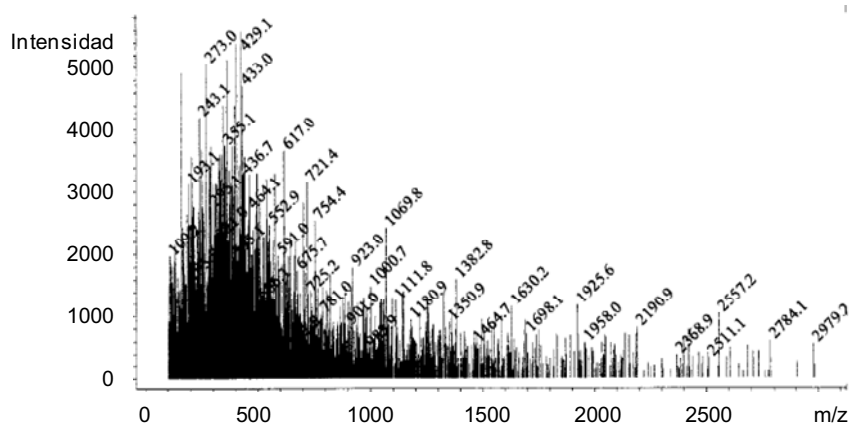


Figura 1.9. Espectro ESI-MS de los ácidos fúlvicos del río Suwannee ⁸¹

La capacidad de complejación de metales con los ácidos húmicos y fúlvicos es un hecho conocido y tiene un marcado efecto en la especiación y toxicidad de los metales pesados, por ejemplo provenientes de la actividad antropogénica (p.ej. Cd, Cu, Cr, Ni, Mn, Fe, Zn), para el medio ambiente ¹⁰⁸. Algunas investigaciones han demostrado una complejación de Cu^{+2} por parte de sustancias húmicas acuáticas de hasta 1.6 mmol por gramo de carbono orgánico (101.6 mg de Cu^{+2} por gramo de carbono orgánico) ⁹⁵.

Finalmente comentar que también se ha demostrado la capacidad de las sustancias húmicas para aumentar la solubilidad en agua de algunos contaminantes (p.ej. pesticidas) no polares ⁶⁷.

Parte IV. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE THMs

Las investigaciones pioneras llevadas a cabo por Rook y Bellar en 1974^{5,6} demostrando que el cloro reaccionaba con la MON presente en las aguas potables para dar lugar a los THMs constituyeron un hito en la historia de los SPDs^{4,16,17}. La complejidad de las moléculas orgánicas que representan la MON del agua ha provocado que el estudio de los mecanismos de formación de los SPDs con los diferentes desinfectantes empleados en el tratamiento de aguas se haya basado en compuestos modelos muy alejados de las estructuras reales de los componentes de la MON. Un objetivo de estas investigaciones ha sido y es determinar cuáles son los principales precursores (orgánicos e inorgánicos) y qué variables influyen en la formación de SPDs. La respuesta de esta cuestión podría servir para determinar cual podría ser el tratamiento óptimo para un agua natural.

La Figura 1.10 muestra las estructuras modelo empleadas basándose en la caracterización de la MON. Se propone que estas moléculas modelo están presentes en la mayoría de análisis de la MON.

En cuanto al estudio de las variables que intervienen en el proceso de formación de SPDs generalmente incluyen como modelos de la MON a ácidos húmicos y fúlvicos (obtenidos por concentración de aguas naturales y disponibles comercialmente como materiales de referencia), taninos y terpenoides, compuestos aromáticos (derivados del ácido benzoico) y fenólicos (resorcinol, fenol), compuestos nitrogenados (amino ácidos, péptidos, proteínas, clorofila, algas), ácidos carboxílicos (principalmente el ácido cítrico) y compuestos β -dicarbonílicos.

Compuestos aromáticos

Fenoles y derivados

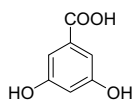


Fenol



Resorcinol

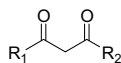
Derivados ácido hidroxibenzoico



ácido 3,5 dihidroxibenzoico

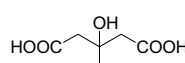
Compuestos alifáticos

β-dicetonas



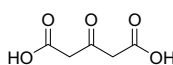
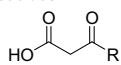
2,4 pentanodiona

Ácidos policarboxílicos



ácido cítrico

β-cetoácidos



ácido 3-oxopentanodioico

Amino ácidos

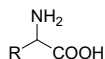


Figura 1.10. Principales modelos de la MON que han sido estudiados

como precursores de SPDs

IV.1 Formación de THMs a partir de compuestos fenólicos

Tradicionalmente se ha considerado a las sustancias húmicas como compuestos formados mayoritariamente por unidades estructurales de resorcinol^{109,110} que serían los principales responsables de la formación de THMs. Sin embargo, también se ha demostrado que otras unidades estructurales como son los compuestos β-dicarbonílicos, tanto aromáticos como alifáticos también son importantes precursores de THMs.

La Tabla 1.2 muestra valores de producción de CHCl₃ a partir de la cloración de compuestos mono-, di- y trihidroxibenzenos^{110,111}. Además se indica la demanda de cloro de algunos de dichos compuestos. Se entiende por demanda de cloro la cantidad de cloro requerida para obtener un residual mínimo de cloro, generalmente 1 mg L⁻¹, tras un período de reacción determinado. Se puede observar la mayor reactividad para dar lugar a CHCl₃ de los compuestos 1,3-dihidroxibenzenos y 1,3-dicetonas respecto a los correspondientes isómeros estructurales 1,2 y 1,4, debido al sitio activo C2 entre los dos hidroxilos o carbonilos. Además se observa que el ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico y el compuesto 1,3,5-trihidroxibenceno, debido a la presencia de 2 y 3 sitios activados por grupos hidroxilo, son

los compuestos que producen mayores cantidades de CHCl_3 . No obstante, se acepta actualmente que los compuestos con un sitio activo son los que más se asemejan a los ácidos húmicos (ver apartado IV.4). Además, algunos autores consideran que la velocidad de reacción y la producción de THMs a partir de resorcinol es demasiado elevada para representar a todos los precursores de THMs contenidos en la MON ¹¹¹ y que el fenol y compuestos derivados representan mejor las constantes de velocidad promedio de la MON y los valores de THMs obtenidos. Así las velocidades iniciales para la reacción del cloro con resorcinol y fenol son 100 y $0.24 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, y las producciones de THMs en los mismos dos compuestos es 0.95 y $0.11 \text{ mol CHCl}_3 \text{ mol}^{-1}$ de sustrato, respectivamente. Se ha estimado que el fenol y derivados podrían ser los responsables de hasta el 70% de todo el THM de la MON ^{109,111}.

Tabla 1.2. Demanda de cloro y producción de CHCl_3

	Demanda de cloro (mol de cloro mol^{-1} de sustrato)	Moles $\text{CHCl}_3 \text{ mol}^{-1}$ de sustrato
Monohidroxiaromáticos		
Fenol	9.5 ^a -10.5 ^b	0.06 ^a - 0.11 ^b
Metilfenol	10.5 ^b	0.02 ^b
2-clorofenol	9.4 ^b	0.10 ^b
3-clorofenol	9.5 ^b	0.32 ^b
4-clorofenol	9.8 ^b	0.11 ^b
2,4-diclorofenol	8.0 ^b	0.10 ^b
2,4,6-triclorofenol	8.0 ^b	0.10 ^b
2,4,5-triclorofenol	8.5 ^b	0.28 ^b
2,3,4,6-tetraclorofenol	7.2 ^b	0.29 ^b
Dihidroxiaromáticos		
1,3-dihidroxibenceno	7.9 ^a	0.67 ^a - 0.95 ^b - 0.79 ^c
1,2-dihidroxibenceno		0.01 ^c
1,4-dihidroxibenceno		0.01 ^c
2,6-dihidroxitolueno		0.08 ^c
3,5-dihidroxitolueno		0.58 ^c
Ácido 2,4-dihidroxibenzoico		0.68 ^c
Ácido 3,5-dihidroxibenzoico		0.73 ^c
Trihidroxiaromáticos		
1,2,3-trihidroxibenceno		0.01 ^c
1,3,5-trihidroxibenceno		0.86 ^c
Ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico		1.14 ^c

^a Condiciones de reacción: [sustrato] = 15 μM , ratio molar cloro/sustrato 35, 22 °C y pH 8, 24 h ¹¹²

^b Condiciones de reacción: [sustrato] = 4 μM , $[\text{HClO}] = 140 \mu\text{M}$, pH = 8, 23 °C ¹¹¹

^c Condiciones de reacción: [sustrato], pH 7, 24h, 10 °C, razón molar cloro/sustrato 10 ¹¹⁰

IV.2 Formación de THMs a partir de compuestos β -dicarbonílicos

La formación de THMs a partir de compuestos β -dicarbonílicos en estructuras aromáticas y alifáticas ha sido propuesta por varios autores¹¹⁰⁻¹¹³. La Tabla 1.3 incluye, entre otros, ejemplos de modelos de compuestos β -dicarbonílicos aromáticos y alifáticos. El resorcinol se puede considerar igualmente un compuesto β -dicarbonílicos pero enmascarado, ya que es más estable que su iómero tautómero β -dicarbonílicos.

Tabla 1.3. Demanda de cloro y producción de CHCl_3

	Demanda de cloro (mol de cloro /mol de sustrato)	Moles CHCl_3 / mol de sustrato
Resorcinol ^a	7.9	0.67
Ácido 3-oxopentanodioico ^{a,b}	5.3	0.71
Ácido 2-oxopentanodioico ^b	1.4	0.002
Ácido 4-oxoheptanodioico ^b	1.25	0.005
Ácido 3-oxohexanodioico ^{a,b}	5.8	0.83
Ácido 3-oxobutanodioico ^{a,b}	3.8	0.006
Ácido 4,6-dioxophetanoico ^{a,b}	4.8	0.86
Ácido 5,7-dioxooctanoico ^{a,b}	6.0	0.91
Ácido 2-oxobutírico ^b	1.1	0.001
Ácido 3-hidroxiбутаноico ^b	1.2	0.029
Ácido cítrico ^b	0.49	0.012
Ácido 1,3-propanodioico ^{a,c}	1.6	<0.001
Acetoacetato de etilo ^{a,c}	1.7	0.002

^a Compuesto β -dicarbonílico

^b Condiciones de reacción: [sustrato] = 15 μM , ratio molar cloro/sustrato 35, 22 °C y pH 8, 24h

^c Condiciones de reacción: pH7, 20 °C, razón molar cloro/sustrato 7

En dichos estudios se ha demostrado que algunos de estos compuestos son potencialmente precursores de THMs (ácido 4,6-dioxoheptanoico, ácido 5,7-dioxooctanoico, ácido 3-oxohexanodioico, y 3-oxopentanodioico). Sin embargo otros compuestos como el ácido 1,3-propanodioico y compuestos alifáticos dicarbonílicos alifáticos, los cuales tienen dos grupos carbonilos que son parte de los grupos funcionales del ácido carboxílico, no dan lugar a concentraciones importantes de THMs. Así se concluyó que para la formación de CHCl_3 ó CHBr_3 en compuestos alifáticos se necesita una dicetona (e.j ácido 5,7 – dioxooctanoico) ó un grupo cetona y un grupo carboxilo (p.ej. 3-oxohexanodioico).

IV.3 Cloración de compuestos nitrogenados

La cloración de aguas naturales donde haya presente algas, proteínas, péptidos y amino ácidos se caracteriza por su elevada demanda de cloro ^{82,114}. Por ejemplo la demanda de cloro (moles de Cl₂ consumido por mol de sustrato, a 20 °C y 72 horas) para el triptófano, la tirosina, histidina y arginina oscila entre 8 y 16, mientras que el resto de amino ácidos libres oscila entre 2.5 y 6. En el caso de péptidos la demanda oscila alrededor de 20 y en proteínas puede alcanzar más 200.

Respecto a la formación de THMs de los 21 amino ácidos naturales son el triptófano y la tirosina los que originan la mayor formación de CHCl₃ con valores de 45.8 y 147 µg mg⁻¹. El resto de amino ácidos tienen una formación menor de 4.19 µg mg⁻¹. Respecto a la formación de HAAs existe una mayor variación en su formación dependiendo de la estructura del amino ácido desde no HAAs detectables hasta 106 µg mg⁻¹, siendo el triptófano, la tirosina, la histidina, el ácido aspártico y la asparagina los amino ácidos con valores más altos ¹¹⁴. Además la producción de TOX llega a ser de más de 500 µg de Cl⁻ por mg de carbono para el caso de la tirosina, triptófano e histidina. Hay que tener en cuenta que el valor bajo condiciones similares de los ácidos húmicos oscila entre 100 y 200 µg de Cl⁻ por mg de carbono.

Respecto a la formación de THMs en proteínas (p.ej albúmina sérica bovina, pepsina, renina) el valor de THMs tras 5 días de cloración (5 mg L⁻¹ de sustrato, pH 7 y 20 °C) es de unos 110 µg L⁻¹, mientras que el TOX oscila alrededor de 250 µg de Cl⁻ por mg de carbono ⁸⁴.

IV.4 Variables que afectan a la formación de THMs

Los mecanismos exactos de formación de THMs a partir de la MON son, a día de hoy, todavía desconocidos ¹¹⁵. Sin embargo, se sabe que ciertas variables influyen en estos procesos y a continuación se comentan algunas de las variables más importantes que influyen en la formación de SPDs.

Tiempo de contacto, temperatura y pH

Aumentando el tiempo de contacto la formación de THMs (ver Figura 1.11) y de HAAs, aumenta ¹¹⁶. Sin embargo, la concentración de otros SPDs como trihalocetonas, trihaloaldehídos y trihalonitrometanos disminuye con el tiempo como resultado del proceso de hidrólisis dando lugar, generalmente, a los correspondientes THMs. Esto indica que estos compuestos son intermedios en la formación de THMs, a su vez, tal y como se observa en la Figura 1.11a, conforme aumenta la temperatura aumenta la formación de CHCl_3 .

Respecto al pH, en la Figura 1.11b se muestra cómo afecta dicha variable a la formación de SPDs en el proceso de cloración de ácidos húmicos a 10 °C ¹¹⁶. De manera general en las aguas naturales y en disoluciones de ácidos húmicos un incremento de pH da lugar a un aumento de la concentración de THMs, pero a un decrecimiento de los niveles de HAAs ^{110,117} y otros SPDs halogenados (p.ej. trihalocetonas, trihaloacetoneitrilos, trihaloacetaldehídos, trihalonitrometanos y ácidos trihaloacéticos) incluyendo el carbono halógeno total. La reducción se produce por sufrir estos SPDs reacciones de hidrólisis dando lugar a otros SPDs (p.ej. THMs).

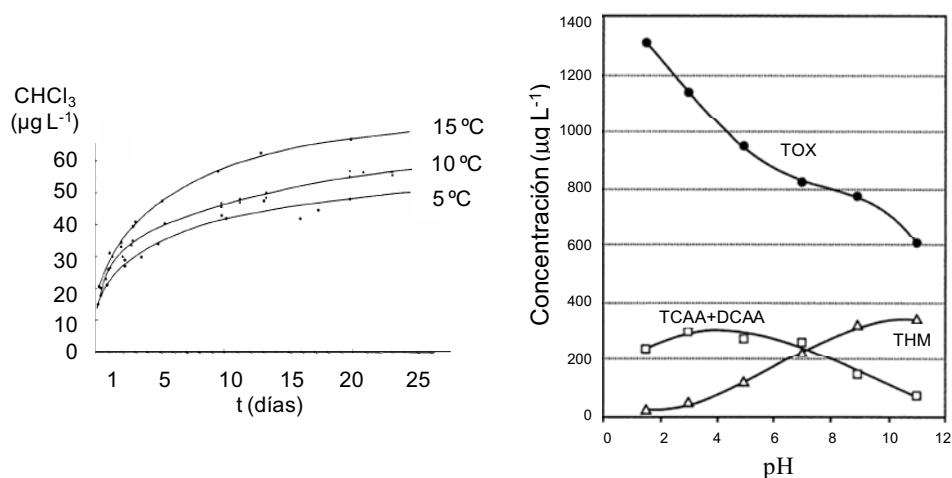
No obstante, este efecto puede ser diferente en función de la estructura del compuesto ¹¹⁰. Así, por ejemplo el resorcinol, y de modo similar la 1,3 ciclohexanodiona, alcanza el máximo de producción de CHCl_3 alrededor de pH de 9 y a partir de este pH la curva es decreciente hasta 12. Por otra parte, el ácido 1,3,5-trihidroxibenzoico tiene un máximo de producción de CHCl_3 alrededor de pH 5 y decrece a partir de este valor

alcanzando un mínimo a pH 12. Este comportamiento en función del pH ha sido tenido en cuenta, para elegir al resorcinol como modelo de las sustancias húmicas en vez del ácido 1,3,5-trihidroxibenzoico aún cuando este último produce mayor cantidad de CHCl_3 por mol de sustrato.

Figura 1.11. Influencia de la temperatura, el pH y el tiempo de contacto en la formación de SPDs

Influencia de la temperatura en la formación de CHCl_3 a partir de la cloración (8 mg L^{-1}) de ácidos húmicos (5 mg L^{-1}) a pH 8 (a).

Influencia del pH en la formación de CHCl_3 a partir ácidos húmicos (b)



Concentración de cloro y TOC

De manera general, aumentando la concentración de MON (p.ej. aumento en TOC) y la dosis de cloro aumenta la concentración de SPDs.

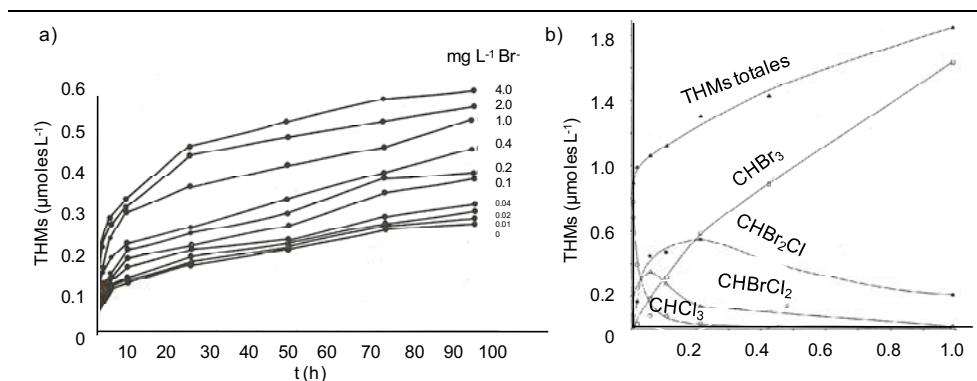
IV.5 Precursores inorgánicos en la formación de THMs

Influencia de aniones inorgánicos en la formación de THMs

Numerosos estudios, tanto de aguas naturales como de compuestos modelo, han demostrado que la presencia de bromuro en el proceso de cloración afecta a la formación de THMs. La presencia de bromuro afecta en tres aspectos básicamente: aumentando la concentración de THMs. totales, la velocidad de reacción así como la distribución de THMs^{112,118} (ver Figura 1.12).

La influencia de la concentración de cloruros durante el proceso de cloración ha sido un efecto menos revisado en la bibliografía. Algunos estudios muestran que la cloración de ácidos húmicos comerciales (Aldrich) en presencia de diferentes cantidades de cloruro, con o sin bromuro, produce un aumento en la formación de THMs ¹¹⁹. Respecto a la presencia del ión yoduro en el agua su importancia radica en la formación de algunos SPDs yodados que pueden ser causantes de olores medicinales no deseable en aguas potables incluso a concentraciones de pocos $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹²⁰.

Figura 1.12. Influencia de la concentración de bromuro en la formación de THMs



a Condiciones de reacción: 1 mg L^{-1} de ácidos húmicos, 5 mg L^{-1} de cloro libre, pH 7, 20 °C.

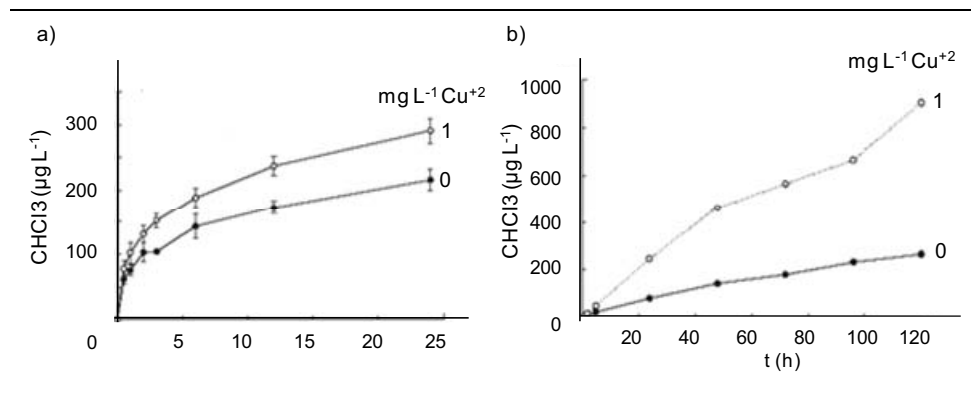
b Condiciones de reacción: 2.5 mg L^{-1} de ácidos fúlvicos, 25 mg L^{-1} de cloro libre, pH 7, 20 °C y 24 h de reacción.

Influencia de cationes inorgánicos en la formación de THMs

A pesar de la conocida capacidad de las sustancias húmicas y de otros compuestos orgánicos de solubilizar e interactuar con iones metálicos presentes en las aguas naturales, la posibilidad de que exista una influencia de interacciones metal-ligando orgánico en el contexto de una formación mayor de SPDs ha sido poco estudiada. Puesto que las tuberías de cobre son ampliamente utilizadas en los sistemas de distribución de agua potable en todo el mundo, debido a su efecto bactericida para algunas especies, algunos investigadores han estudiado la influencia del cobre en la formación de SPDs (THMs y HAAs principalmente) ¹²¹⁻¹²⁵. La Figura 1.13 muestra algunos de los resultados

obtenidos por Blatchley y colaboradores ¹²⁶ que demuestran que la formación de SPDs tras la cloración de distintos compuestos modelo (resorcinol, 2-metil resorcinol, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dihidroxibenzoico, lisina, ácido cítrico y ácidos húmicos) aumenta en presencia de Cu^{+2} .

Figura 1.13. Aumento de la formación de CHCl_3 en presencia de Cu^{+2} en la cloración de ácidos húmicos (a) y ácido cítrico (b)



Hay que tener en cuenta sin embargo que aunque los anteriores trabajos representan un hito en cuanto a la idea que metales puedan influir en la formación de THMs y/o HAAs en ocasiones las concentraciones ensayadas, de hasta 1 mg L^{-1} de Cu^{+2} , son de escasa relevancia para la mayoría de aguas naturales.

IV.6 Reacciones del cloro con compuestos modelo

Tras haber revisado las variables que influyen en el proceso de formación de THMs en los siguientes puntos se muestran los mecanismos propuestos para la formación de THMs a partir de compuestos modelo de la MON tras reacción con el cloro.

Reacción del haloformo

Entre las reacciones que producen THMs la llamada reacción del haloformo (Figura 1.14) es la que más veces se ha invocado como última reacción en la formación de THMs ¹¹⁰. Normalmente, se describe la reacción en base a una metil cetona como precursor

orgánico. La primera etapa del proceso, la formación de un enol, generalmente es la etapa limitante de velocidad. A continuación el enol sufre una halogenación rápida, con entrada del halógeno en el grupo metilo. La halogenación continúa con etapas análogas hasta que el grupo metilo está trihalogenado. La trihalocetona resultante posteriormente es atacada por un hidróxido para dar lugar una molécula de THM y el anión (la base conjugada) del ácido carboxílico.

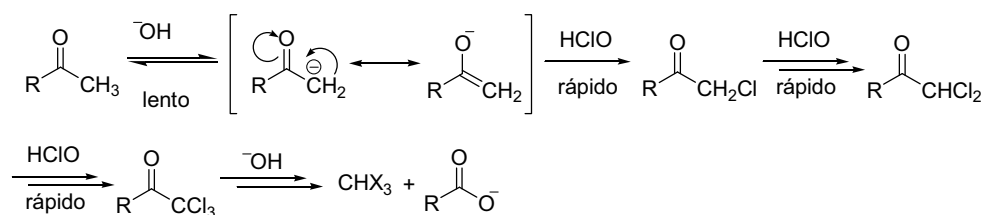


Figura 1.14. Mecanismo de la reacción del haloformo

Mecanismo de reacción de formación de THMs a partir de la halogenación de compuestos modelo dihidroxiaromáticos de los ácidos húmicos

Uno de los mecanismos más estudiados ha sido la cloración de compuestos derivados de 1,3-dihidroxibencenos por producir este tipo de compuestos elevadas cantidades de THMs^{110,127-130}. Entre todos destaca el propuesto por Boyce y Horning 1983¹²⁹. El mecanismo propuesto, que está basado en la reacción del haloformo, incluye una serie de reacciones comenzando por sustitución electrofílica, seguida de apertura oxidativa del anillo aromático, adición y descarboxilación y en donde la reacción tiene lugar en el carbono activado no sustituido entre los dos grupos funcionales hidroxilos. El mecanismo propuesto por Boyce y Horning para la formación de THMs a partir de 1,3-dihidroxibencenos se muestra en la Figura 1.15.

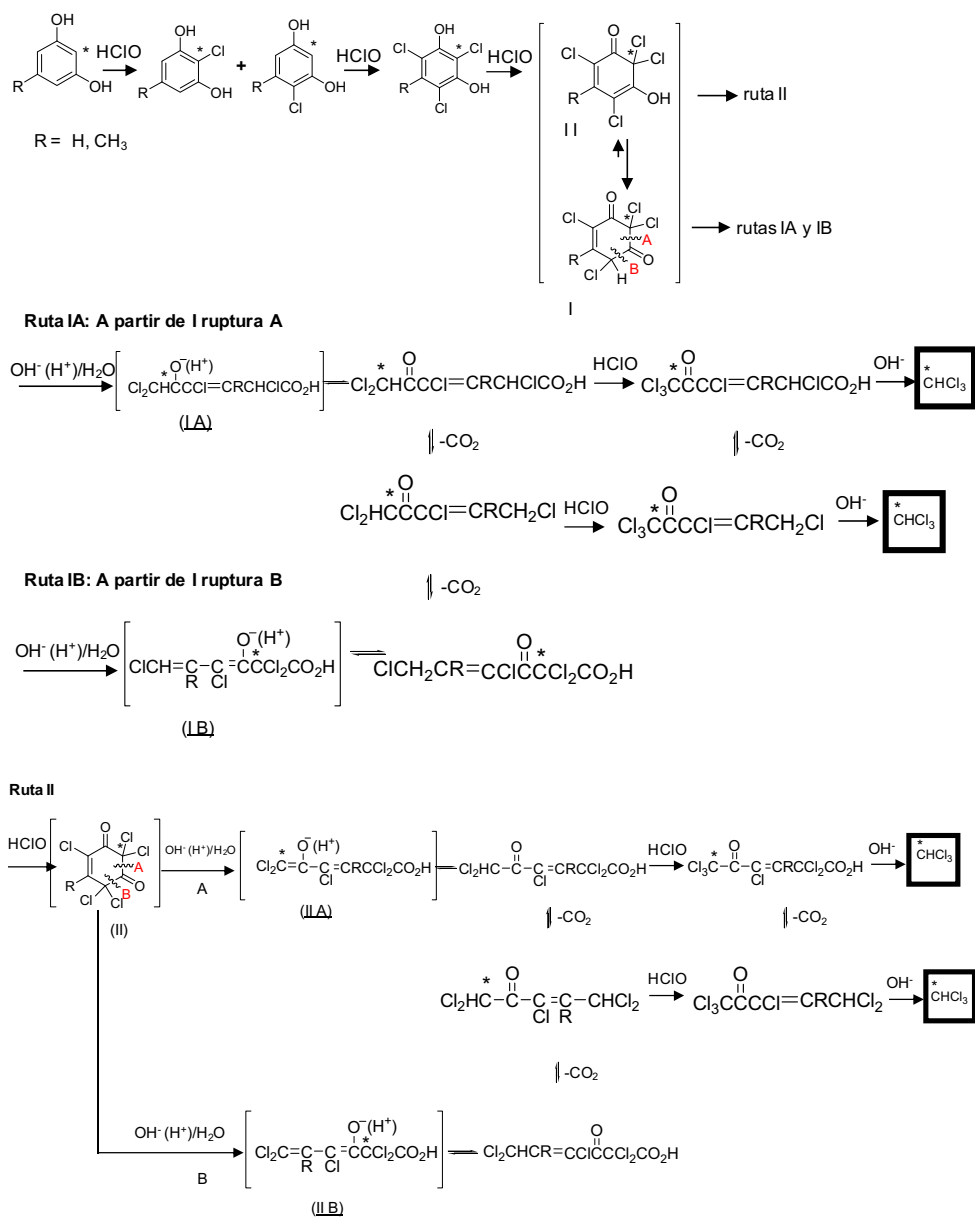


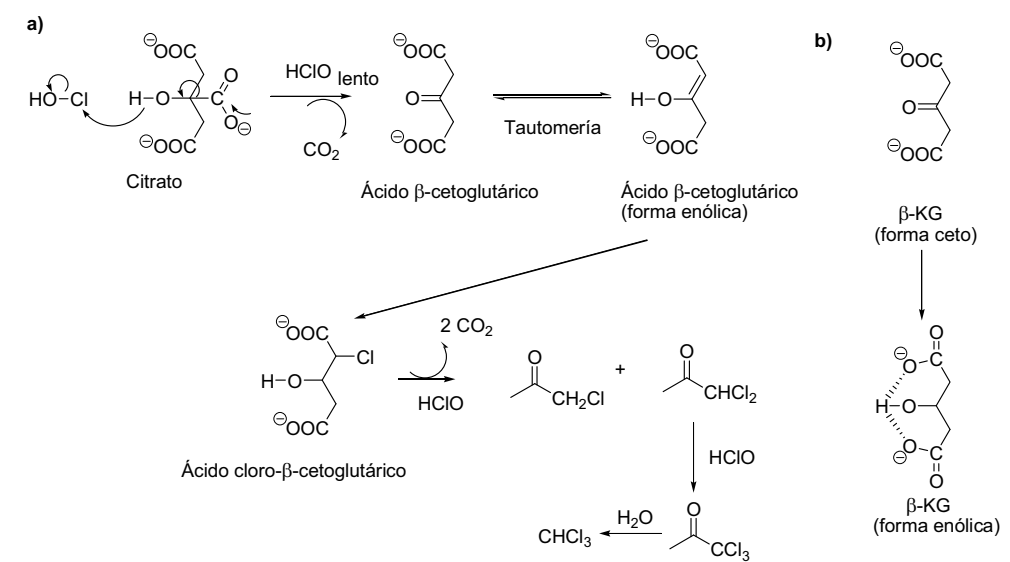
Figura 1.15. Mecanismo propuesto de reacción para la conversión de sustratos 1,3-dihidroxiaromáticos en CHCl_3 . Los asteriscos indican los carbonos isotópicamente enriquecidos en ^{13}C .

La confirmación de que los THMs se formaban principalmente en el sitio activado C₂ de 1,3-bencenodiolos se consiguió tras realizar una serie de experimentos de halogenación (con cloro y bromo) empleando resorcinol marcado isotópicamente. Estos resultados demostraron que el cloroformo y el bromoformo se producían casi exclusivamente por un camino de reacción mediante la ruptura C-C en la posición del C₂ de la estructura del anillo del precursor aromático que es el que resulta finalmente halogenado. Además, la cloración del resorcinol-2-¹³C a pH 4 produjo el ácido tricloroacético-2-¹³C, lo cual apoya que la formación de subproductos triclorometil-sustituídos ocurre en medio ácido según la reacción del haloformo.

Mecanismo de formación de CHCl₃ a partir de citrato

El mecanismo propuesto para la reacción del cloro con citrato en disolución acuosa para dar cloroformo se indica en la Figura 1.16¹³¹.

Figura 1.16. Mecanismo de reacción del citrato con cloro (a) y estructura del ácido β-cetoglutarico (β - KG) y su forma enólica (b).



La primera etapa de reacción es el ataque del HClO al hidrógeno alcoholico del citrato seguido por descarboxilación dando lugar ácido β -cetoglutárico (β -KG). El β -KG reacciona rápidamente con HClO a pH 7, dando lugar a una alta producción de CHCl_3 . Esta elevada reactividad del β -KG puede ser debida a la estabilidad del enol conjugado con grupos carboxilato disponibles además para enlazarse con el enol por puentes de hidrógeno. A partir de esta etapa el mecanismo de reacción entre el β -KG y el HClO puede ser similar al de cloración de cetonas catalizadas en medio ácido, en el cual una forma enólica está directamente implicada en la etapa de cloración para formar cloro- β -KG.

Descomposición de HAAs para dar lugar a THMs

Los trihaloacéticos (THAAs) constituyen una fracción molar importante del total de HAAs formados en la cloración de las sustancias húmicas o aguas naturales¹³². Los THAAs incluyen al ácido tricloro-, bromodicloro-, dibromocloro-, y tribromoacético (TCAA, BDCAA, DBCAA y TBAA). Es conocido que estos ácidos descomponen para dar THMs. La Figura 1.17 muestra los perfiles temporales de descomposición a pH 7 y 23 °C de algunos de estos ácidos THAA en agua pura.

En los diferentes mecanismos propuestos de formación de THMs y de HAAs no se contempla la posibilidad que los THMs deriven de los HAAs. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado que los THAAs (excepto el TCAA) pueden sufrir descarboxilación 25 °C para dar lugar a los correspondientes THMs (Figura 1.17) en condiciones relevantes en potabilización de aguas¹³³⁻¹³⁵. La variable que más influye en dicha descarboxilación es la temperatura mientras que el pH (en el rango 6-9 y fijando la temperatura a 23 °C) apenas influye en el proceso.

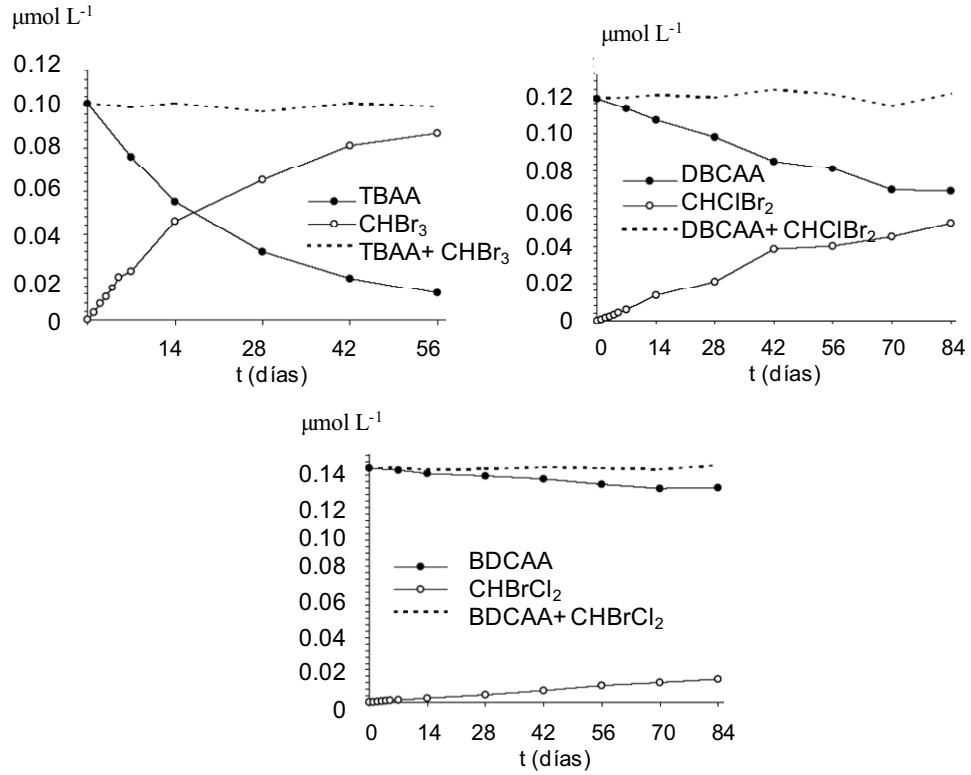


Figura 1.17. Descomposición de THAAs ($30 \mu\text{g L}^{-1}$) y formación de THMs en agua Milli-Q tamponada a pH 7 y 23 °C.

Parte V. CONTAMINANTES EMERGENTES EN LAS AGUAS DE ABASTECIMIENTO Y AGUAS POTABLES

Además de los SPDs otros tipos de contaminantes en las aguas de abastecimiento e incluso en las aguas potables están siendo motivo de preocupación en los últimos años por diferentes implicaciones de salud pública y medio ambiental ^{3,24,136-138}.

Los productos químicos liberados en el medio ambiente pueden actuar como alteradores endocrinos (AEs). El sistema endocrino es el responsable del desarrollo, crecimiento, reproducción y comportamiento en humanos y animales. Hay indicios que los AEs producen efectos fisiológicos negativos en la fauna silvestre y que pueden producir cambios en la salud reproductiva de los seres humanos, incluyendo la disminución de la fertilidad masculina, defectos de nacimiento, y cáncer de mama y testicular.

La mayoría de los AEs son compuestos orgánicos sintéticos (p. ej. tensoactivos, pesticidas, productos farmacéuticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), policlorobifenilos (PCBs), retardantes de llama bromados y ftalatos) que se introducen en el medio ambiente antropogénicamente, aunque algunos se producen de manera natural (p.ej. estrona, 17 β -estradiol). Los AEs antropogénicos y naturales son ubicuos en los medios acuáticos que reciben los efluentes de las plantas depuradoras. Este hecho suscita una preocupación sobre la exposición a este tipo de compuestos de los animales y seres humanos ¹³⁹⁻¹⁴¹.

V.1 Compuestos farmacéuticos

Entre los diferentes grupos de AEs los compuestos farmacéuticos y sus metabolitos han atraído recientemente mucha atención por parte de la comunidad científica internacional debido a que se están detectando frecuentemente en el medio ambiente (p.ej. en efluentes de plantas depuradoras, en aguas superficiales, en aguas subterráneas y en aguas de mar)^{136,137,142-150}. Hay que tener en cuenta que el consumo anual de antibióticos en España es de unas 300 toneladas anuales.

Un tema de interés actual es el posible desarrollo de bacterias resistentes¹⁵¹⁻¹⁵³ a los antibióticos, como resultado de la exposición de efluentes sin tratar de hospitales y efluentes de aguas residuales domésticas^{154,155}. A esto hay que sumar los efectos genotóxicos de algunas drogas¹⁵⁶, y la alteración endocrina inducida por hormonas sintéticas o naturales¹⁵⁷. Los efectos de la combinación de todos estos factores a largo plazo sobre los organismos todavía son desconocidos.

Las principales categorías de compuestos farmacéuticos para consumo humano y los productos más comúnmente encontrados en el medio ambiente se muestran en la Figura 1.18^{136,142,158,159}. Además muchos de los compuestos farmacéuticos sufren transformaciones o degradaciones en el cuerpo humano¹⁴⁷, en las plantas depuradoras¹⁶⁰, en procesos bióticos (p.ej. hidrólisis)¹⁶¹ y/o abióticos (p.ej. fotólisis)^{162,163} dando lugar a una variedad significativa de metabolitos o subproductos en el medio ambiente acuático los cuales también pueden tener efectos adversos debido a que su toxicidad puede ser similar o mayor a los compuestos primarios.

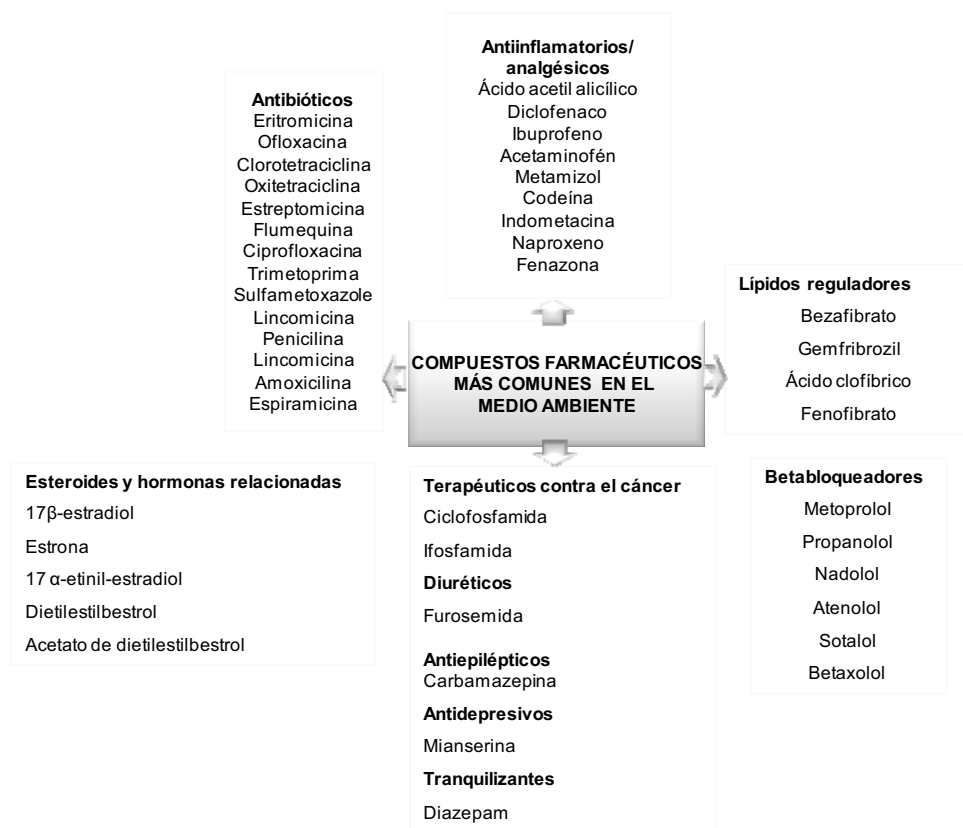


Figura 1.18. Los compuestos farmacéuticos más comunes en el medio ambiente.

Hoy en día, debido en gran parte a las razones mencionadas los compuestos farmacéuticos están considerados como contaminantes medioambientales emergentes

V.2 Origen de la contaminación química de los recursos acuáticos

Tal y como se muestra en la Figura 1.19, los productos farmacéuticos y sus metabolitos pueden entrar en el medio ambiente ¹⁶⁶ principalmente a través de la excreción (p.ej. humana, desde hogares y hospitales, o animal desde granjas), de las basuras (domésticas, industriales o de actividades veterinarias), de campos agrícolas (conteniendo productos farmacéuticos veterinarios tras aplicación de estiércol o fangos de depuradora y la posterior escorrentías) ^{167,168}, de lixiviados de vertederos y de la eliminación de los efluentes residuales municipales e industriales ^{136,142,151}. De forma análoga, otros compuestos fitosanitarios y de uso veterinario pueden llegar igualmente a las aguas naturales. La contaminación industrial constituye otra fuente de contaminación de aguas de gran importancia. Debido a todas estas acciones se han encontrado muchos compuestos orgánicos tóxicos, incluyendo los farmacéuticos, en las aguas superficiales ^{146,169-176}, subterráneas ^{177,178}, incluso en las aguas potables ^{138,175,179-181}.

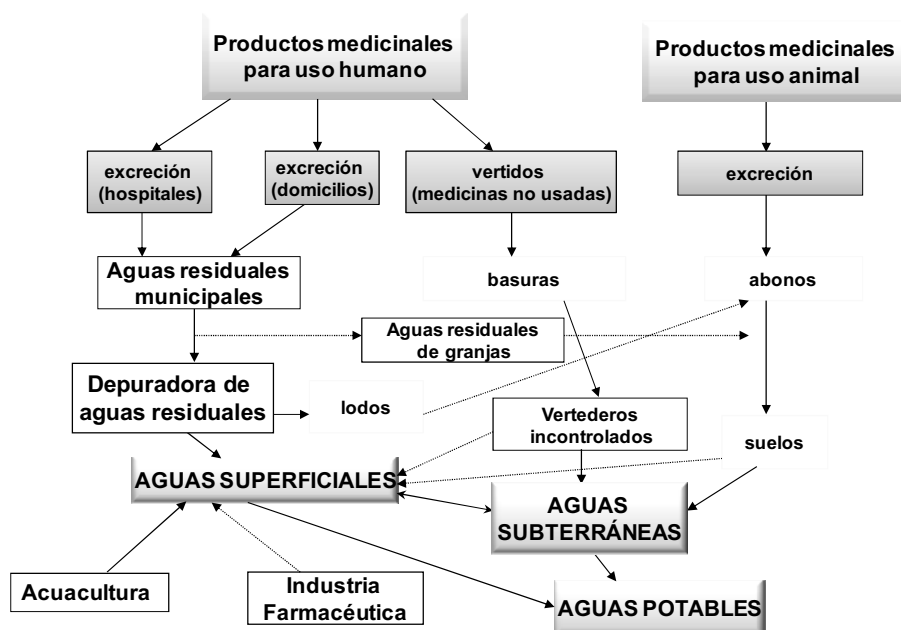


Figura 1.19. Posible origen de residuos farmacéuticos en el medio ambiente acuático.

V.3 Reducción de compuestos farmacéuticos

Muchas depuradoras y todas las plantas de tratamiento de aguas potables emplean oxidantes y/o desinfectantes químicos (p.ej. cloro, ozono, dióxido de cloro y cloraminas) con el objeto de mantener los niveles microbiológicos reglamentarios. El uso de compuestos oxidantes plantea el problema de en qué forma estos agentes desinfectantes reaccionan con los contaminantes presentes en los recursos acuáticos, cuáles son los productos de degradación y la toxicidad de los mismos. Es por ello que en los últimos años ha habido gran interés en estudiar la interacción de los agentes desinfectantes más empleados (Cl_2 , ClO_2 , O_3)¹⁸²⁻¹⁸⁵ así como procesos de oxidación avanzada (p.ej. $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, fenton/fotofenton, UV/TiO_2)¹⁸⁶⁻¹⁹¹ con compuestos farmacéuticos que están siendo detectados en los recursos acuáticos. Otro aspecto de interés es determinar si la adsorción sobre carbón activo (granular o en polvo) o empleo de membranas es capaz de eliminar estos contaminantes emergentes^{192,193}.

La mayor parte de los estudios de degradación de compuestos farmacéuticos han sido realizados empleando O_3 como oxidante. Los valores de la constante de velocidad aparente (k_{app}) a pH 7 varían entre 1 y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Algunos ejemplos han demostrado que el empleo de O_3 en el tratamiento del 17α -etinilestradiol da lugar a una reducción de la actividad estrogénica¹⁸⁴. Sin embargo, otros estudios sobre la ozonización de nitroimidazoles¹⁸³ (metronidazol, dimetridazol, tinidazol y rodinazol) han conluido que los compuestos de oxidación pueden ser más tóxicos que los originales nitroimidazoles según el procedimiento normalizado de inhibición de la bacteria *Vibrio fisheri*.

Cuando la oxidación se realiza con HClO los valores varían entre 10^{-2} y $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que cuando se emplea ClO_2 los valores varían entre 10^{-2} y $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Aún con todo, algunos autores han indicado la necesidad de estudios similares a los realizados con O_3 para el caso del Cl_2 y el ClO_2 , con objeto de determinar la eficiencia de eliminación de dichos compuestos así como la determinación de los subproductos de oxidación resultantes y la toxicidad que de ellos puede derivarse. La respuesta de todas

estas cuestiones ayudará al desarrollo de nuevos métodos para salvaguardar el medioambiente y a los organismos vivos de cualquier efecto nocivo para la salud procedente de todas estas sustancias.

V.4 Contaminantes emergentes y sus SPDs

En el apartado I se ha descrito la incidencia de los SPDs a partir de la materia orgánica natural encontrada en el agua potable o de abastecimiento. Sin embargo, tal y como se ha comentado anteriormente las fuentes de abastecimiento de agua potable también están afectadas por las emisiones municipales e industriales ^{137,194}. De manera similar a la materia orgánica natural del agua se ha demostrado que algunos de estos contaminantes también pueden reaccionar con los desinfectantes empleados en el proceso de tratamiento de aguas para formar sus propios subproductos. Por ejemplo, se ha estudiado que la cloración en piscinas produce la transformación de compuestos activos empleados como protectores solares para dar lugar a subproductos halogenados ^{194,195}. La mayor parte de estas reacciones de desinfectantes han sido llevadas a cabo en estudios controlados en el laboratorio y en la mayoría de los casos todavía no han sido identificados en las aguas potables aunque es razonable admitir que procesos análogos tienen lugar en los tratamientos de potabilización ²¹. A su vez el objetivo de otras investigaciones para encontrar los métodos para degradar y eliminar estos contaminantes de los efluentes de las depuradoras y de las fuentes de abastecimiento de las aguas potables. La formación de SPDs a partir de estos contaminantes se produce porque muchos de ellos tienen anillos aromáticos activados que pueden reaccionar fácilmente con cloro, ozono o dióxido de cloro. Sin embargo la presencia y toxicología de los productos de reacción formados a partir de los contaminantes antropogénicos todavía no ha sido investigada con el detalle necesario

²¹.

PARTE VI. REACCIÓN DEL ClO₂ CON COMPUESTOS PRESENTES EN LOS RECURSOS ACUÁTICOS

En la parte I del capítulo de Introducción se ha descrito la relevancia del cloro como agente desinfectante. Entre los principales inconvenientes destaca la ineficiencia para la desinfección de algunos microorganismos (p.ej. *Cryptosporidium* y *Giardia*) y la formación de compuestos orgánicos halogenados algunos de los cuales pueden ser carcinógenos y mutagénicos. Además el pH de muchas aguas naturales oscila alrededor de 8 y por lo tanto predomina el ClO⁻ sobre el HClO, el cual es un desinfectante menos eficiente que el HClO. Básicamente por estas razones en el tratamiento de aguas potables y residuales se emplean desinfectantes alternativos (p.ej. en desinfección primaria) entre los que destacan el dióxido de cloro (ClO₂).

VI.1 El ClO₂ en el tratamiento de aguas

El ClO₂ es uno de los desinfectantes alternativos al cloro que más atención ha recibido en los últimos años ¹⁹⁶. Las mayores ventajas del ClO₂ en el tratamiento de aguas potables y residuales es que no forma e incluso reduce los niveles THMs, HAAs ^{196,197}, no forma bromatos ¹⁹⁸ y presenta una mayor inactivación de virus y protozoos (especialmente *Cryptosporidium* y *Giardia*) con respecto al cloro ¹⁹⁶. Además, el ClO₂ es un biocida y oxidante altamente efectivo en un amplio rango de pH incluso a concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ ^{196,199}, y evita la generación de películas de microorganismos sobre paredes (p.ej. en tuberías) cuando se mantienen concentraciones residuales en el rango de 0.05-0.1 mg L⁻¹ ²⁰⁰. Por lo tanto, el ClO₂ está siendo empleado cada vez más como un oxidante y/o desinfectante alternativo en el tratamiento de aguas potables y residuales.

Las dosis máximas de ClO₂ empleadas en potabilización oscilan entre 1 y 1.4 mg L⁻¹ ^{200,201} pues el empleo de concentraciones mayores podrían producir niveles de clorito superiores a 1 mg L⁻¹ que es el límite máximo fijado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ²⁰² en las aguas potables. Además, se descompone en

clorito y cloratos en medio básico y con la luz UV por lo que se prefiere la generación *in-situ* para su uso controlado.

VI.2 Reactividad del ClO₂

El ClO₂ es un radical libre y relativamente estable que en fase gas tiene un intenso color amarillo y un olor ácido ²⁰³. Es altamente soluble en agua aunque no se hidroliza y permanece en disolución como un gas disuelto ²⁰⁴. El ClO₂ actúa como un oxidante selectivo, debido a su reactividad que consiste en transferencia de un electrón y a su potencial de oxidación moderado, con moléculas orgánicas que contienen centros ricos en electrones reduciéndose él a ión clorito ²⁰³. En los casos donde la especiación de los sustratos no varía con el pH la reactividad del ClO₂ no cambia significativamente en un rango de 2 a 10.5. Esto está de acuerdo con la estructura química del ClO₂ en disolución acuosa la cual no varía con el pH.

Compuestos inorgánicos

El ClO₂ no oxida al ión bromuro por lo que en el tratamiento de aguas no transforma el ión bromuro en hipobromito, y por lo tanto no se producen compuestos orgánicos bromados ni bromato. Esta característica es una importante diferencia respecto al empleo de cloro y al ozono como agentes oxidantes en desinfección. Por contra el ión yoduro se oxida fácilmente en presencia de ClO₂ dando lugar a yodo el cual se hidroliza en agua para dar principalmente ácido hipoyodoso. El ClO₂, frecuentemente empleado en aguas brutas, no reacciona con el amonio. Esta una de las razones históricas por las que el ClO₂ ha sido empleado como desinfectante en muchas plantas de tratamiento. Finalmente comentar que el ión nitrito se oxida a nitrato en presencia de ClO₂.

Compuestos orgánicos

Se ha establecido que el ClO₂ reacciona con grupos fenólicos, compuestos de azufre y en menor medida con aminas terciarias mientras que es prácticamente despreciable la reacción frente a hidrocarburos. La reactividad de los fenoles y aminas depende en gran medida de la especiación de los mismos, puesto que la reactividad del ión fenóxido y la forma neutra de la amina es muchos ordenes de magnitud mayor que la reactividad de la forma neutra del fenol y de la amina protonada. El ClO₂ reacciona con los ácidos húmicos aumentando la velocidad de reacción por un factor de 3 por unidad de pH (en el rango entre 4 y 8).

Los estudios de reactividad del ClO₂ comentados anteriormente han permitido establecer los mecanismos básicos de reacción del ClO₂, no obstante es aún necesario determinar la reactividad del ClO₂ frente a otros compuestos encontrados en la MON o con aquellos considerados como contaminantes emergentes. Este tipo de estudios tendría una especial relevancia en el tratamiento de aguas puesto que de este modo se conocerían tres cuestiones importantes y diferenciadas como son: 1) mecanismo de acción del ClO₂ con MON, 2) efectividad del ClO₂ frente a la eliminación de contaminantes emergentes, 3) productos de reacción y/o SPDs. Siendo estos puntos previos para la determinación posterior de la toxicidad de los SPDs de reacción del ClO₂.

Reactividad con compuestos orgánicos de la MON

A pesar que se conoce que el ClO₂ reduce el contenido de THMs, cuando se emplea como preoxidante, pocos trabajos han estudiado el mecanismo de reacción. Únicamente hay un trabajo que estudia con detalle el mecanismo de reacción del ClO₂ con citrato (ver Figura 1.20). En dicho estudio¹³¹ tras hacer reaccionar el ClO₂ con citrato no se observó la presencia de CHCl₃. Además cuando el ClO₂ estaba presente en la mezcla de reacción con HClO y citrato, se observó una reducción en la producción de CHCl₃. Dicha reducción se atribuye a la reacción del ácido β-cetoglutarico (β-KB) con el ClO₂ para dar

lugar al ácido malónico. Puesto que la cloración del β -KB por HClO es mucho más rápida que la oxidación de β -KB por el ClO_2 es necesario admitir que debe haber otros intermedios involucrados en el proceso. El esquema reactivo propuesto se muestra en la Figura 1.20. Se ha indicado que tanto la monocloroacetona como dicloroacetona reacciona con ClO_2 para producir ácido acético. Únicamente un 10% del HClO, a 37 °C y 30 min de incubación, reacciona con el ClO_2 añadido. Además no se observó oxidación de CHCl_3 por el ClO_2 en las condiciones estudiadas en el trabajo.

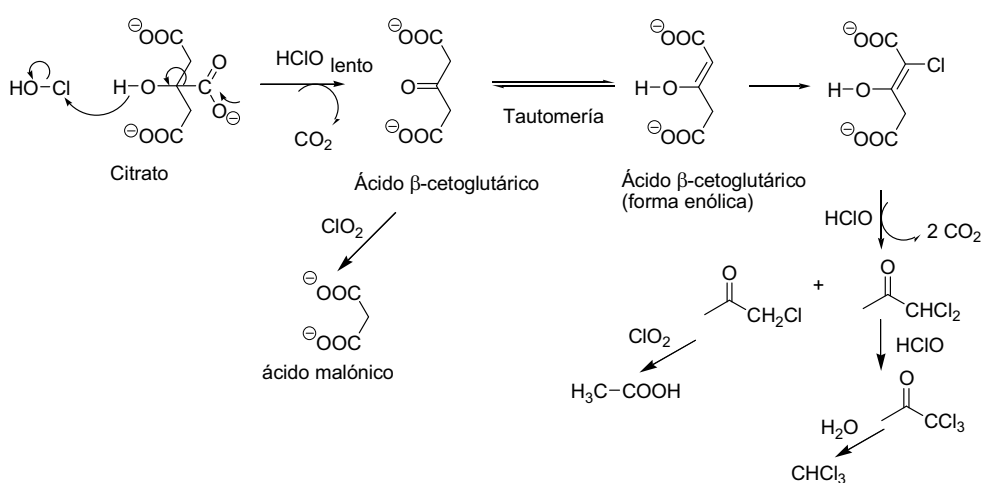


Figura 1.20. Mecanimo de reacción del ClO_2 con citrato en presencia de cloro.

Reactividad con compuestos farmacéuticos

Considerando la importancia actual del ClO_2 en el tratamiento de aguas así como la presencia de los contaminantes emergentes en las aguas de entrada a las plantas potabilizadoras y depuradoras han surgido estudios encaminados a determinar la reactividad del ClO_2 con ciertos compuestos químicos que puedan estar presentes en aguas como contaminantes.

Entre los escasos trabajos que existen de reactividad del ClO_2 con distintos compuestos farmacéuticos destaca el de Huber y colaboradores ¹⁸² empleando aguas naturales como matriz para llevar a cabo las reacciones. Los resultados demostraron la

reactividad del ClO_2 con sulfonamidas (sulfametoxazol), antibióticos macrólidos (roxitromicina) y estrógenos (17α -etinilestradiol). No obstante, para los compuestos bezafibrato, carbamazepina, diazepam, ibuprofeno, iopromida no se observó reacción con el ClO_2 .

En comparación con otros desinfectantes y/o oxidantes, el O_3 parece ser considerablemente más eficiente para el control de fármacos porque exhibe unas mayores velocidades de reacción y reacciona con un mayor número de compuestos farmacéuticos. Sin embargo, el ClO_2 parece ser ligeramente más oxidante que el cloro para la oxidación de compuestos farmacéuticos.

PARTE VII. ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS RESISTENTES EN EL AGUA POTABLE

La introducción del cloro como agente desinfectante, junto con la filtración, representó a principios del siglo XX uno de los mayores logros en cuanto a salud pública se refiere y actualmente es el proceso universal para llevar a cabo la desinfección de aguas. Sin embargo se conoce que no es eficiente en la inactivación de algunas esporas, quistes, ooquistes y virus²⁰⁵⁻²⁰⁷.

La presencia de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* es frecuente en muchos ambientes acuáticos, aguas superficiales o aguas residuales²⁰⁸, lo que ha hecho que se conviertan en parámetros a tener en cuenta como indicadores de la calidad biológica del agua. Según diversos estudios los ooquistes de *Cryptosporidium* están presentes al menos en el 50% de las aguas superficiales del mundo, siendo más frecuentes que los quistes *Giardia*. Actualmente estos protozoos parásitos entéricos son causa de patologías emergentes y están relacionados con brotes de transmisión hídrica por ingestión del agua. Su capacidad para generar este tipo de brotes se asocia con su resistencia a los procesos habituales de tratamiento de las aguas, siendo más resistentes a la desinfección química que los indicadores tradicionales de contaminación fecal como son los coliformes fecales. Además se conoce que pueden permanecer viables en el agua durante largos periodos de tiempo en condiciones adversas²⁰⁹.

Por todo ello, hay un interés reciente en la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras de agua por parte de las autoridades sanitarias públicas y las industrias del agua.

VII.1 Legislación

En la legislación europea (Directiva europea de aguas 98/93) no hay un parámetro de obligado cumplimiento para los protozoos *Cryptosporidium* o *Giardia*. Únicamente se cita que en las aguas superficiales que contengan *Clostridium perfringens*, incluidas sus

esporas, deberán ser investigadas para evaluar la presencia de *Cryptosporidium*. Serán las autoridades de salud pública de cada país miembro las que deberán establecer si los niveles detectados del parásito suponen un riesgo para la salud pública.

A efectos del Real Decreto 140/2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, un agua de consumo humano será salubre y limpia cuando no contenga ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia, en una cantidad o concentración que pueda suponer un riesgo para la salud humana, y cumpla con los requisitos especificados en las partes A (parámetros microbiológicos) y B (parámetros químicos) del anexo I de este Real Decreto. Los parámetros microbiológicos exigibles en España son tres: *Escherichia coli*, *enterococos* y *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas), con valores paramétricos de 0 unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 ml. Pero además se especifica que en el caso de que la determinación de *Clostridium perfringens* sea positiva y exista una turbidez mayor de 5 unidades nefelométricas de turbidez (UNT) se determinarán, en la salida de la estación de tratamiento de agua potable o depósito, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, *Cryptosporidium* u otros microorganismos parásitos.

VII.2 Análisis de *C.Parvum* y *G.Lambli*a

La detección y cuantificación de los quistes de *Giardia* y los ooquistes de *Cryptosporidium* se basa generalmente en un método desarrollado por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos denominado "método US EPA 1623". Este proceso consta de cuatro fases: 1) concentración por filtración, elución y centrifugación; 2) separación inmunomagnética (IMS) con perlas recubiertas de anticuerpos anti-pared del quiste/ooquiste; 3) observación y recuento de los quistes/ooquistes por inmunofluorescencia (IF); 4) confirmación mediante tinción vital (4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI).

Cabe mencionar que el presente método no permite determinar la infectividad ni viabilidad de los quistes/ooquistes de *Giardia* y *Cryptosporidium*. Así podría ser que la técnica diera recuento positivo de quistes/ooquistes de estos protozoos que se encuentren muertos o inactivados por el tratamiento.

VII.3 Resistencia a los desinfectantes químicos

Cryptosporidium Parvum

Entre las principales especies de *Cryptosporidium*, la especie denominada *Parvum* es la principal causante de infecciones en humanos dando lugar a enfermedades diarreicas. Los ooquistes de *Cryptosporidium* son los patógenos entéricos más resistentes conocidos a la mayoría de procesos de desinfección química y al tratamiento convencional de aguas. Hay que tener en cuenta que las concentraciones de cloro típicamente usadas en el tratamiento de aguas potables oscila alrededor de 1-2 mg L⁻¹. Asimismo los quistes de *Giardia* (8-12 µm) y los ooquistes de *Cryptosporidium* (4-6 µm) son bastante pequeños por lo que pueden no ser eliminados durante la filtración.

Korich²¹⁰ llevó a cabo un estudio de los efectos del ozono, del dióxido de cloro, del cloro y de las cloraminas en la viabilidad de ooquistes de *Cryptosporidium Parvum*. La conclusión fue que el ozono y el dióxido de cloro son dos desinfectantes químicos más efectivos en la inactivación de ooquistes de *Cryptosporidium* que el hipoclorito y las cloraminas (ver Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Dosis necesarias a 25 °C de distintos desinfectantes para la inactivación^a del 90% de ooquistes de *Cryptosporidium Parvum*.

	Dosis (mg L ⁻¹)
Ozono	1
Dióxido de cloro	1.3
Cloro a pH 7	80
Cloraminas	80

a. La inactivación se midió como la infección desarrollada por ratones tras suministrarles ooquistes de *C.Parvum* que habían sido tratados con las dosis indicadas y un tiempo de contacto de 90 min.

Este estudio demuestra pues la ineficiencia del proceso de desinfección por cloro frente a contaminación por *C.Parvum*

Giardia Lamblia

El parásito flagelado *Giardia Lamblia* es el causante de la giardiasis, una grave enfermedad diarreica de los seres humanos ²¹¹.

Respecto a la inactivación de quistes de *Giardia Lamblia* varios trabajos ^{212,213} han demostrado que, aunque en menor medida que el *C.Parvum*, también es resistente al tratamiento con cloro

Tabla 1.5. Datos para el 99% de inactivación de *G.Lamblia* por cloro libre a pH 7

	T (°C)	C (mg L ⁻¹)	Tiempo (min)
Cloro libre	25	1.5	<10
	5	2.0-4.0	30 – 60
	5	2.5	48

VII.4 Desinfección fotocatalítica

Los estudios de desinfección fotocatalítica en el tratamiento de aguas se han centrado principalmente en la bacteria *E.Coli* (un indicador de contaminación fecal) ²¹⁴, aunque también se han estudiado algunas otras especies de bacterias (p. ej. *Enterobacter cloacae*) ²¹⁵, virus (p.ej. *Lactobacillus casei* phage PL-1, *Poliovirus* 1) ^{216,217} protozoos (p.ej. *Cryptosporidium*, *Giardia*) ^{218,219}, fungi (p.ej. *Aspergillus Níger*) y algas (p.ej. *Chlorella vulgaris*) ²²⁰. Sin embargo, la desinfección UV a gran escala es cara y la desinfección catalítica puede reducir los costes ²¹⁹.

Los sistemas que mayor atención han recibido en la literatura han sido aquellos que utilizan el fotocatalizador suspendido en disolución en vez de inmovilizado sobre algún soporte ²²¹. Este hecho es debido principalmente a que con esta configuración se obtiene la que mayor área superficial de fotocatalizador por unidad de volumen. Sin embargo, también presenta varios inconvenientes importantes haciendo a esta tecnología difícilmente viable, sobre todo para los procesos en continuo con elevados caudales como es el caso del tratamiento de aguas ^{222,223}. El principal problema se encuentra en la difícil separación del catalizador de la suspensión debido a su pequeño tamaño de partícula (generalmente decenas de nanómetros) haciendo inviable la filtración por los elevados costes de

operación. Por otra parte, se puede producir la agregación de las partículas suspendidas cuando se trabaja con elevadas concentraciones de fotocatalizador con la consecuente pérdida de eficiencia fotocatalítica ²¹⁹. Además, la turbidez de la disolución aumenta con la cantidad del TiO₂ en polvo haciendo que la radiación UV sea difractada de modo que la eficiencia de la irradiación UV disminuye si se sobrepasa una cierta concentración de catalizador. Dicho de otra manera, únicamente la superficie del fotocatalizador que está iluminada es activa, lo cual en un sistema en suspensión es muy difícil debido a que las partículas más alejadas de la fuente de luz están protegidas de la misma por aquellas que están más cerca de dicha luz.

Por otra parte, muchos de los trabajos emplean disoluciones de microorganismos preparadas con agua ultra pura, y no con aguas reales, lo cual puede originar que los resultados obtenidos no sean del todo representativos respecto a las aguas en las que éstos normalmente se encuentran. Además el contenido de sales y su naturaleza influye en la velocidad de la desinfección de manera análoga a como influye la degradación fotocatalítica de compuestos orgánicos ²²². La presencia de H₂PO₃²⁻ y HCO₃⁻ disminuye la velocidad de desinfección. Por ejemplo la presencia de S₂O₃²⁻ inhibe la fotoactivación de la bacteria *E.Coli* ²²⁴. Además se conoce que experimentos con agua desionizada puede alterar los resultados, debido a la pérdida de Ca⁺² y Mg⁺² de la superficie de la membrana celular dando lugar finalmente a una membrana celular más permeable o dañada ²²⁵.

Debido a las ventajas en el diseño del fotorreactor en los últimos años se está trabajando en el desarrollo de fotocatalizadores soportados sobre diferentes materiales ²²⁶ de manera que pudiera ser aplicación en el de tratamiento de aguas. La principal limitación es básicamente la baja área superficial de fotocatalizador en el sistema con respecto a una suspensión, no obstante permite el flujo en continuo haciendo a la tecnología viable en el tratamiento de aguas. La disposición general del fotocatalizador es una película fina sobre una superficie la cual está completamente iluminada. Los soportes que han sido empleados

incluyen películas poliméricas ^{227,228}, soportes de carbón activo ²²⁹, cerámicas ²²⁶ y vidrio (p.ej. fibras, pirex, cuarzo) ²³⁰⁻²³².

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] EL Hall, AM Dietrich: A Brief History of Drinking Water. American Water Works Association. *Opflow* 26 (2000) 46-49.
- [2] EV Ohanian, CS Mullin, J Orme: Health effects of disinfectants and disinfection by-products: a regulatory perspective, *Water Chlorination: Chem. Environ. Impact Health Effects* 6. (1989).
- [3] SD Richardson: Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 666-84.
- [4] SD Richardson: Drinking water disinfection by-products. *Encyclopedia Environ. Anal. Remed.* 3 (1998) 1398-421.
- [5] JJ Rook: Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat. Examin.* 23 (1974) 234-43.
- [6] TA Bellar, JJ Lichtenberg, RC Kroner: Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *J. Am. Water Works Assoc.* 66 (1974) 703-06.
- [7] SD Richardson, JE Simmons, G Rice: Disinfection byproducts: the next generation. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 198A-205A.
- [8] SW Krasner, HS Weinberg, SD Richardson, SJ Pastor, R Chinn, MJ Scilimenti, GD Onstad, JAD Thruston: The occurrence of a new generation of disinfection by-products. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7175-85.
- [9] MG Muellner, ED Wagner, K McCalla, SD Richardson, YT Woo, MJ Plewa: Haloacetonitriles vs. regulated haloacetic acids: are nitrogen containing DBPs more toxic? *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 645-51.
- [10] E Cemeli, ED Wagner, D Anderson, SD Richardson, MJ Plewa: Modulation of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct iodoacetic acid by suppressors of oxidative stress. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1878-83.
- [11] MJ Plewa, ED Wagner, SD Richardson, AD Thruston Jr., Y Woo, AB McKague: Chemical and biological characterization of newly discovered iodoacid drinking water disinfection byproducts. *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4713-22.
- [12] MJ Plewa, ED Wagner, P Jazwierska, SD Richardson, PH Chen, AB McKague: Halonitromethane drinking water disinfection byproducts: chemical characterization and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 62-68.
- [13] MJ Plewa, Y Kargalioglu, D Vanker, RA Minear, ED Wagner: Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environ. Mol. Mutagen.* 40 (2002) 134-42.
- [14] RJ Bull, SW Krasner, PA Daniel, RD Bull: Health Effects and Occurrence of Disinfection By-products, AWWAResearch Foundation, Denver, CO. (2001).
- [15] IARC, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic, vol. 84, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2004.
- [16] GA Boorman, V Dellarco, JK Dunnick, RE Chapin, S Hunter, F Hauchman, H Gardner, M Cox, RC Sills: Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation. *Environ. Health Perspect.* 107 (1999) 207-17.
- [17] Y-T Woo, D Lai, JL McLain, MK Manibusan, V Dellarco: Use of mechanism-based structure-activity relationships analysis in carcinogenic potential ranking for drinking water disinfection by-products. *Environ. Health Perspect.* 110 (Supp.1) (2002) 75.
- [18] S Monarca, SD Richardson, D Feretti, M Grottole, AD Thruston Jr., C Zani, G Navazio, P Ragazzo, I Zerbini, A Alberti: Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 309-18.
- [19] S Batterman, L Zhang, S Wang: Quenching of chlorination disinfection by-product formation in drinking water by hydrogen peroxide. *Water Res.* 34 (2000) 1652-58.
- [20] SD Richardson, AD Thruston Jr., TW Collette, KS Patterson, BW Lykins Jr., JC Ireland: Identification of TiO₂/UV disinfection byproducts in drinking water. *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 3327-34.
- [21] SD Richardson, MJ Plewa, ED Wagner, R Schoeny, DM DeMarini: Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutat. Res.* 636 (2007) 178-242.
- [22] AA Stevens, LA Moore, CJ Slocum, BL Smith, DR Seeger, JC Ireland: Disinfection by-products: current perspectives, American Water Works Association, Denver, CO. (1989).
- [23] SD Richardson, AD Thruston Jr., TV Caughran, PH Chen, TW Collette, TL Floyd, KM Schenck, BW Lykins Jr., G Sun, G Majetich: Identification of new drinking water disinfection byproducts formed in the presence of bromide. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3378-83.
- [24] SD Richardson: Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 74 (2002) 2719-42.
- [25] ILSI, Identification of new and uncharacterized disinfection by-products in drinking water, workshop report, International Life Sciences Institute, Washington, DC, USA, 1999.
- [26] H Weinberg: Disinfection By-Products in Drinking Water. *Anal. Chem.* 71 (1999) 801-08.
- [27] Kopfler, F.C., Melton, R.G., Lingg, R.D., Coleman, W.E. GC/MS determination of volatiles for the national organics reconnaissance survey (NORS) of drinking water, in: L.H. Keith (Ed.), Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1976, pp. 87-104.
- [28] National Cancer Institute, Report on the carcinogenesis bioassay of chloroform (CAS no. 67-66-3), National Cancer Institute, TR-000 NTIS Rpt No. PB264018, Bethesda, MD, 1976.
- [29] JC Loper: Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutat. Res.* 76 (1980) 241-68.

- [30] IARC, Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals, vol. 63, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1995.
- [31] RD Morris: Drinking water and cancer. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 8) (1995) 225-31.
- [32] KP Cantor, C Villanueva, M Garcia-Closas, D Silverman, FX Real, M Dosemeci, N Malats, M Yeager, R Welch, S Chanock: Bladder cancer, disinfection byproducts, and markers of genetic susceptibility in a case-control study from Spain. *Epidemiology* 17 (2006) S150.
- [33] K Waller, SH Swan, G DeLorenze, B Hopkins: Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology* 9 (1998) 134-40.
- [34] SH Swan, K Waller, B Hopkins, G Windham, L Fenster, C Schaefer, RR Neutra: A prospective study of spontaneous abortion: relation to amount and source of drinking water consumed in early pregnancy. *Epidemiology* 9 (1998) 126-33.
- [35] K Waller, SH Swan, GC Windham, L Fenster: Influence of exposure assessment methods on risk estimates in an epidemiologic study of total trihalomethane exposure and spontaneous abortion. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 11 (2001) 522-31.
- [36] MJ Nieuwenhuijsen, MB Toledano, NE Eaton, J Fawell, P Elliott: Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occup. Environ. Med.* 57 (2000) 73-85.
- [37] MD Kramer, CF Lynch, P Isacson, JW Hanson: The association of waterborne chloroform with intrauterine growth retardation. *Epidemiology* 3 (1992) 407-13.
- [38] A Aschengrau, S Zierler, A Cohen: Quality of community drinking water and the occurrence of late adverse pregnancy outcomes. *Arch. Environ. Health* 48 (1993) 105-13.
- [39] FJ Bove, MC Fulcomer, JB Klotz, J Esmart, EM Dufficy, JE Savrin: Public drinking water contamination and birth outcomes. *Am. J. Epidemiol.* 141 850-62.
- [40] DA Savitz, KW Andrews, LM Pastore: Drinking water and pregnancy outcome in central North Carolina: source, amount, and trihalomethane levels. *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 592-96.
- [41] MD Gallagher, JR Nuckols, L Stallones, DA Savitz: Exposure to trihalomethanes and adverse pregnancy outcomes. *Epidemiology* 9 (1998) 484-89.
- [42] P Magnus, JJ Jaakkola, A Skrondal, J Alexander, G Becher, T Krogh, E Dybing: Water chlorination and birth defects. *Epidemiology* 10 (1999) 513-17.
- [43] JB Klotz, LA Pynch: Neural tube defects and drinking water disinfection by-products. *Epidemiology* 10 (1999) 383-90.
- [44] L Dodds, W King, C Woolcott, J Pole: Trihalomethanes in public water supplies and adverse birth outcomes. *Epidemiology* 10 (1999) 233-37.
- [45] WD King, L Dodds, AC Allen: Relation between stillbirth and specific chlorination by-products in public water supplies. *Environ. Health Perspect.* 108 (2000) 883-86.
- [46] L Dodds, WD King: Relation between trihalomethane compounds and birth defects. *Occup. Environ. Med.* 58 (2001) 443-46.
- [47] DA Savitz, PC Singer, KE Hartmann, AH Herring, HS Weinberg, C Makarushka, C Hoffman, R Chan, R Maclehorse: Drinking Water Disinfection By-products and Pregnancy Outcome, AWWA Research Foundation, Denver, CO. (2005).
- [48] RJ Bull: Carcinogenic properties of brominated haloacetates, in: Workshop report-disinfection by-products in drinking water. Critical issues in health effects research, International life sciences institute, Washington, DC, USA. (1995).
- [49] MJ Plewa, ED Wagner, AC Kim, R Nelson, SD Richardson: Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of new drinking water DBPs, presentation. *Environ. Mutagen Soc. Conf*, Miami Beach, FL, USA. (2003).
- [50] ESI Hunter, JA Tugman: Inhibitors of glycolytic metabolism affect neurulation-staged mouse conceptuses in vitro. *Teratology* 52 (1995) 317-23.
- [51] MJ Nieuwenhuijsen: Adverse reproductive health effects of exposure to chlorination disinfection by products. *Global Nest. J.* 7 (2005) 128-44.
- [52] AM Miles, PC Singer, DL Ashley, MC Lynberg, P Mendola, PH Langlois, JR Nuckols: Comparison of trihalomethanes in tap water and blood. *Environ Sci. Technol.* 36 (2002) 1692-98.
- [53] F Benoit, H Nicolidakis, K Cardinall, C Alleyne, B Mori: Characterization of chloroform levels in the breathing zone of showers by GC/MS. *Proc. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1997) 212-18.
- [54] LC Backer, DL Ashley, MA Bonin, FL Cardinali, SM Kieszak, JV Wooten: Household exposures to drinking water disinfection by-products: whole blood trihalomethane levels. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 10 (2000) 321-26.
- [55] KL Froese, MI Sinclair, SE Hrudey: Trichloroacetic acid as a biomarker of exposure to disinfection by-products in drinking water: a human exposure trial in Adelaide, Australia. *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 679-87.
- [56] B Levesque, P Ayotte, R Tardif, G Charest-Tardif, E Dewailly, D Prud'Homme, G Gingras, S Allaire, R Lavoie: Evaluation of the health risk associated with exposure to chloroform in indoor swimming pools. *J. Toxicol. Environ. Health* 61 (2000) 225-43.
- [57] G Aggazzotti, G Fantuzzi, E Righi, G Predieri: Blood and breath analyses as biological indicators of exposure to trihalomethanes in indoor swimming pools. *Sci. Total Environ.* 217 (1998) 155-63.
- [58] CM Villanueva, KP Cantor, JO Grimalt, G Castaño-Vinyals, N Malats, D Silverman, A Tardon, R Garcia-Closas, C Serra, A Carrato: Assessment of lifetime exposure to trihalomethanes through different routes. *Occup. Environ. Med.* 63 (2006) 273-77.

- [59] CM Villanueva, KP Cantor, JO Grimalt, N Malats, D Silverman, A Tardon, R Garcia-Closas, C Serra, A Carrato, G Castano-Vinyals, R Marcos, N Rothman, FX Real, M Dosemeci, M Kogevinas: Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming in pools. *Am. J. Epidemiol.* 165 (2007) 148-56.
- [60] U.S. Environmental Protection Agency, National interim primary drinking water regulations: control of trihalomethanes in drinking water: final rules, *Fed. Reg.* 44 (1979) 68624-705.
- [61] U.S. Environmental Protection Agency, National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection byproducts; final rule, *Fed. Reg.* 63 (1998) 69390 - 476.
- [62] European Union, Council directive 98 / 83 / EC of 3 november 1998 relating to the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Communities L.* 330 (1998) 32-54.
- [63] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, (BOE, 21 de febrero de 2003), por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.
- [64] PC Singer, GW Harrington: Coagulation of DBP precursors: theoretical and practical considerations. *Proc. Water Quality technol. Conf., American Water Works Assoc., Denver, Colo.,* 1-19 (1993).
- [65] DE Kimbrougha, IH Suffet: Electrochemical removal of bromide and reduction of THM formation potential in drinking water. *Water Res.* 36 (2002) 4902-06.
- [66] Swift, R. In *Humic Substances II: In Search of Structure.* Hayes MHB, McCarthy P, Malcolm RL, Swift RS (eds). John Wiley: Chichester. 449, 1989.
- [67] CT Chiou, RL Malcolm, TI Brinton, DE Kile: Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ Sci. Technol.* 20 (1986) 502-08.
- [68] AGS Prado, JD Torres, PC Martins, J Pertusatti, LB Bolzon, EA Faria: Studies on copper(II)- and zinc(II)-mixed ligand complexes of humic acid. *J. Hazard. Mater. B* 136 (2006) 585-88.
- [69] LG Danielsson: On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. *Water Res.* 16 (1982).
- [70] RA Larson, JW Weber: *Reaction mechanisms in environmental organic chemistry.* Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA. (1994).
- [71] EM Thurman: *Organic geochemistry of natural waters,* Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Boston, MA. (1985).
- [72] RA Minear, GL Amy: *Water disinfection and natural organic matter. Characterization and control.* American Chemical Society, Washington, D.C. (1996).
- [73] ME Essington: *Soil and water chemistry: An integrative approach .* CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. (2004).
- [74] J Kaal, KGJ Nierop, JM Verstraten: Interactions between tannins and goethite- or ferrihydrite-coated quartz sand: Influence of pH and evaporation. *Geoderma* 139 (2007) 379-87.
- [75] SD Killops, VJ Killops: *An Introduction to organic geochemistry;* John Wiley & Sons: New York., (1993).
- [76] TR Filley, GD Cody, B Goodell, J Jellison, C Noser, A Ostrofsky: Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Org. Geochem.* 33 (2002) 111-24.
- [77] A Leonowicz, NS Cho, J Luterek, A Wilkolazka, M Wojtas-Wasilewska, A Matuszewska: Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41 (2001) 185-227.
- [78] Christman, R. F.; Oglesby, R. T. In *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions;* Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H., Eds.; Wiley-Interscience: New York. (1971) 769-93.
- [79] EB Kujawinski, PG Hatcher, MA Freitas: High-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) of humic and fulvic acids: Improvements and comparisons. *Anal. Chem.* 74 (2002) 413-19.
- [80] S Haiber, H Herzog: Two-dimensional NMR studies of size fractionated Suwannee River fulvic and humic acid reference. *Environ Sci. Technol.* 35 (2001) 4289-94.
- [81] JA Leenheer, CE Rostad, PM Gates, ET Furlong, I Ferrer: Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73 (2001) 1461-71.
- [82] L Hureiki, JP Croue, B Legube: Chlorination studies of free and combined amino acids. *Water Res.* 28 (1994) 2521-31.
- [84] JFE Scully, GD Howell, R Kravitz, JT Jewell, V Hahn, M eeD: Proteins in natural waters and their relation to the formation of chlorinated organics during water disinfection. *Environ. Health Perspect.* 22 (1988) 537-42.
- [85] U Münster: Amino acid profiling in natural organic matter isolated by reverse osmosis from eight different boreal freshwaters. *Environ Int* 25 (1999) 209-24.
- [86] M Brown: The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145 (1991) 79-99.
- [87] RA Larson, AL Rockwell: Chloroform and chlorophenol production by decarboxylation of natural acids during aqueous chlorination. *Environ. Sci. Technol.* 13 (1979) 325-29.
- [88] G Abbt-Braun, FH Frimmel: In *Refractory organic substances in the environment;* Frimmel, F. H., Abbt-Braun, G., Heumann, K.G., Hock, B., Lüdemann, H.-D., Spiteller, M., Eds.; Wiley- VCH: Weinheim. (2002) 1-38.
- [89] T Reemtsma, A These, A Springer, M Linscheid: Fulvic acids as transition state of organic matter: indications from high resolution mass spectrometry. *Environ Sci. Technol.* 40 (2006) 5839-45.
- [90] Stevenson, F.J. *Humus chemistry genesis, composition, reactions,* Wiley Interscience, New York, USA, 1982.
- [91] P MacCarthy: The principles of humic substances. *Soil Sci.* 166 (2001) 738-51.
- [92] EM Thurman: Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 15 (1981) 463-66.
- [93] GR Aiken, DM McKnight, KA Thorn, EM Thurman: Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Org. Geochem.* 18 (1982) 567-73.

- [94] SM Serkiz, EM Perdue: Isolation of dissolved organic matter from the suwannee river using reverse osmosis. *Water Res.* 24 (1990) 911-16.
- [95] MA Huizhong, EA Herbert, Y Y.: Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research* 35 (2001) 985-96.
- [96] TA Clair, JR Kramer, M Sydor, D Eaton: Concentration of aquatic dissolved organic matter by reverse osmosis. *Water Res.* 25 (1991) 1033-37.
- [97] L Sun, EM Perdue, JF McCarthy: Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters. *Water Res.* 29 (1995) 1471-77.
- [98] JA Leenheer: Progression from model structures to molecular structures of natural organic matter components. *Ann. Environ. Sci.* 1 (2007) 57-68.
- [99] RC Averett, JA Leenheer, DM McKnight, KA Thorn: Humic substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures, U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2373, Denver, CO: U.S Geological Survey. (1994).
- [100] JA Leenheer, DM McKnight, EM Thurman, P MacCarthy: Structural components and proposed structural models of fulvic acid from the Suwannee River. In: Averett RC, Leenheer JA, McKnight DM, Thorn KA. eds. *Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, Properties, and Proposed Structures*. U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2373. Denver, CO: U.S. Geological Survey. (1994) 195-211.
- [101] JA Leenheer, GK Brown, P MacCarthy, SE Cabaniss: Models of metal-binding structures in fulvic acid from the Suwannee River. *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2410-16.
- [102] JA Leenheer, RL Wershaw, GK Brown, MM Reddy: Characterization and diagenesis of strongacid carboxyl groups in humic substances. *Appl. Geochem. Trans.* 18 (2003) 471-82.
- [103] JA Leenheer, CE Rostad: Tannins and terpenoids as major precursors of Suwannee River fulvic acid. *US Geological Survey Scientific Investigations Report 2004-5276*, 17p. (2004).
- [104] JA Leenheer, MA Nanny, C McIntyre: Terpenoids as major precursors of dissolved organic matter in landfill leachates, surface waters, and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2323-31.
- [105] R Beckett, Z Jue, JC Giddings: Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987) 289-95.
- [106] P MacCarthy, JA Rice: Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. In: Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., MacCarthy, P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. John Wiley and Sons, New York, pp. 527-559. (1985).
- [107] A Piccolo, P Conte: Molecular size of humic substances. *Supramolecular associations versus macromolecular polymers*. *Adv. Environ. Res* 3 (1999) 511-21.
- [108] BT Hart: The variation in apparent trace metal complexing capacity of natural waters with plating potential using anodic stripping voltammetry. *Environ. Technol. Lett.* 2 (1981) 95-110.
- [109] DL Norwood, RF Christman: Structural characterization of aquatic humic material. 2. Phenolic content and its relationship to chlorination mechanism in an isolated aquatic fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987) 791-98.
- [110] RL Jolley, WA Brungs, RB Cumming, VA Jacobs: *Water chlorination: environmental impact and health effects*, vol. 3. Ann Arbor Science Publishers, Michigan. (1980).
- [111] H Gallard, Uv Gunten: Chlorination of phenols: kinetics and formation of chloroform. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 884-90.
- [112] ER Dickenson, RS Summers, JP Croué, H Gallard: Haloacetic acid and trihalomethane formation from the chlorination and bromination of aliphatic B-dicarbonyl acid model compounds. *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3226-33.
- [113] DA Reckhow, PC Singer, RL Malcolm: Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations. *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1655-64.
- [114] HC Hong, MH Wong, L Y.: Amino acids as precursors of trihalomethane and haloacetic acid formation during chlorination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56 (2009) 638-45.
- [115] YF Xie: *Disinfection by-products in drinking water. Formation, analysis and control*. Taylor & Francis Group. (2005).
- [116] CJ Peters, RJ Young, R Perry: Factors influencing the formation of haloforms in the chlorination materials. *Environ. Sci. Technol.* 14 (1980) 1391-95.
- [117] G Guo, X Chen: Halogenating reaction activity of aromatic organic compounds during disinfection of drinking water. *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 1207-12.
- [118] WJ Cooper, RG Zika, MS Steinhauer: Bromide-oxidant interactions and THM formation: a literature review. *J. Am. Water Works Assoc.* 77 (1985) 116-21.
- [119] T Nobukawa, S Sanukida: Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water. *Water Res.* 35 (2001) 4293-98.
- [120] RC Hansson, MJ Henderson, P Jack, RD Taylor: Iodoform taste complaints in chloramination. *Water Res.* 21 (1987) 1265-71.
- [121] Y Feng, WK Teo, KS Siow, KL Tan, AK Hsieh: The corrosion behaviour of copper in neutral tap water. Part I. Corrosion mechanisms. *Corros. Sci.* 38 (1996) 369-85.
- [122] FE Scully, GD Howell, M Speed: Effects of copper (II) on the production of trihalomethanes in model and natural waters. In: Jolley RL, editor. *Water chlorination: environmental impact and health effects*, vol. 6. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science. (1987) 703-12.
- [123] D Barnes, PA Fitzgerald, HB Swan: Catalyzed formation of chlorinated organic materials in water. *Water Sci. Technol.* 21 (1989) 59-63.
- [124] B Li, J Qu, H Liu, C Hu: Effects of copper(II) and copper oxides on THMs formation in copper pipe. *Chemosphere* 68 (2007) 2153-60.

- [125] B Li, R Liu, H Liu, J Gu, J Qu: The formation and distribution of haloacetic acids 9 in copper pipe during chlorination. *J. Hazard. Mater.* 152 (2007) 250-58.
- [126] ER Blatchley, D Margetasb, R Duggirala: Copper catalysis in chloroform formation during water chlorination. *Water Res.* 37 (2003) 4385-94.
- [127] JJ Rook: Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of humic acids and resorcinol, in: Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cumming, R.B. (Eds.), *Water Chlorination: Environmental Impact Health Effects*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, vol 3, 1980, pp. 85-98.
- [128] J De Laat, M Merlet, M Doré: Chlorination of organic compounds: chlorine demand and reactivity in relationship to the trihalomethane formation. *Water Res.* 16 (1982) 1437-50.
- [129] SD Boyce, FJ Hornig: Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 17 (1983) 202-11.
- [130] VL Heasley, ME Anderson, DS Combes, DS Elias, JT Gardner, ML Hernandez, RJ Moreland, DF Shellhamer: Investigations of the structure and reactions of the intermediate in the chlorination of resorcinol. *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (1993) 1653-59.
- [131] DH Suh, MS Abdel-Rahman: Mechanism of chloroform formation by chlorine and its inhibition by chlorine dioxide. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5 (1985) 305-131.
- [132] GA Cowman, PC Singer: Effect of bromide ion on haloacetic acid speciation resulting from chlorination and chloramination of aquatic humic substances. *Environ Sci. Technol.* 30 (1996) 16-24.
- [133] H Pourmoghaddas: Effect of bromide on chlorination byproducts other than trihalomethanes in finished drinking water. Ph.D. Dissertation, University of Cincinnati. (1992).
- [134] H Pourmoghaddas, RC Dressman: Determination of nine haloacetic acids in finished drinking water. In: *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference*. Toronto, Canada, 15–19 November. (1993).
- [135] L Heller-Grossman, J Manka, B Limoni-Relis, M Rebhun: Formation and distribution of haloacetic acids, THM and TOX in chlorination of bromide-rich lake water. *Water Res.* 27 (1993) 1323-31.
- [136] CG Daughton, TA Ternes: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107 (Suppl.6) (1999) 907-38.
- [137] DW Kolpin, ET Furlong, MT Meyer, EM Thurman, SD Zaugg, LB Barber, HT Buxton: Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202-11.
- [138] OA Jones, JN Lester, N Voulvoulis: Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 163-67.
- [139] SD Richardson: New Disinfection By-Product Issues: Emerging DBPs and Alternative Routes of Exposure. *Global Nest. J.* 71 (2005) 43-60.
- [140] P Andrzejewski, B Kasprzyk-Hordern, J Nawrocki: N-nitrosomethylethylamine (NMEA) and n-nitrosodiethylamine (NDEA), two new potential disinfection byproducts; formation during water disinfection with chlorine. *Global Nest. J.* 7 (2005) 17-26.
- [141] B Cancho, F Ventura: Optimization of methods for the determination of DBPs. *Global Nest. J.* 7 (2005) 72-94.
- [142] B Halling-Sørensen, SN Nielsen, PF Lanzky, F Ingerslev, HCH Lützhøft, SE Jørgensen: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36 (1998) 357-93.
- [143] TA Ternes: Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32 (1998) 3245-60.
- [144] F Sacher, FT Lange, HJ Brauch, I Blankenhorn: Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 199-210.
- [145] S Weigel, J Kuhlmann, H Hühnerfuss: Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of chllofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci. Total Environ.* 295 (2002) 131-41.
- [146] K Fent, AA Weston, D Caminada: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76 (2006) 122-59.
- [147] S Weigel, U Berger, E Jensen, R Kallenborn, H Thoresen, H Hühnerfuss: Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56 (2004) 583-92.
- [148] SJ Khan, JE Ongerth: Estimation of pharmaceutical residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modeling. *Water Sci. Technol.* 46 (2002) 105-13.
- [149] T Heberer: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett.* 131 (2002) 5-17.
- [150] T Heberer: Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 266 (2002) 175–89.
- [151] B Hileman: Troubled waters: EPA, USGS try to quantify prevalence, risks of compounds from drugs, personal care products. *Chem. Eng. News* 79 (2001) 31-33.
- [152] Sh Yang, K Carlson: Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. *Water Res.* 37 (2003) 4645-56.
- [153] JC Chee-Sanford, RI Aminov, IJ Krapac, N Garrigues-Jeanjean, RI Mackie: Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1494-502.
- [154] Siegener R, C RF.: Caffeine in Boston Harbor seawater. *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 383-87.
- [155] IJ Buerge, T Poiger, MD Muller, HR Buser: Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci. Technol.* 37 (2003) 691-700.

- [156] A Hartmann, AC Alder, T Koller, RM Widmer: Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ.Toxicol Chem.* 17 (1998) 377-82.
- [157] CE Purdom, PA Hardiman, VJ Bye, NC Eno, CR Tyler, JP Sumpter: Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8 (1994) 275-85.
- [158] R Hirsch, T Ternes, K Haberer, KL Kratz: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 225 (1999) 109-18.
- [159] MD Hernando, M Mezcuca, AR Fernández-Alba, D Barceló: Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69 (2006) 334-42.
- [160] L Lishman, SA Smyth, K Sarafin, S Kleywegt, J Toito, T Peart, B Lee, M Servos, M Beland, P Seto: Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* 367 (2006) 544-58.
- [161] M Winkler, JR Lawrence, TR Neu: Selective degradation of ibuprofen and clofibrac acid in two model river biofilm systems. *Water Res.* 35 (2001) 3197-205.
- [162] AL Boreen, WA Arnold, K McNeill: Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review. *Aquat. Sci.* 65 (2003) 320-41.
- [163] C Tixier, HP Singer, S Oellers, SR Müller: Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1061-68.
- [164] D Bendz, NA Paxéus, TR Ginn, FJ Loge: Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 15 (2005) 195-204.
- [165] CH Huang, JE Renew, KL Smeby, K Pinkerston, DL Sedlak: Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resour. Update* 120 (2001) 30-40.
- [166] A Nikolaou, S Meric, D Fatta: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal.Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1225-34.
- [167] P Kay, PA Blackwell, ABA Boxall: Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere* 60 (2005) 497-507.
- [168] AC Johnson, RJ Williams, P Matthiessen: The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Sci Total Environ* 362 (2006) 166-78.
- [169] H-C Chang Chena, P-L Wang, W-H Ding: Using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. *Chemosphere* 72 (2008) 863-69.
- [170] z Moldovan: Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere* 64 (2006) 1808-17.
- [171] W Giger, AC Alder, EM Golet, HPE Kohler, CS McArdell, E Molnar, H Siegrist, MJF Suter: Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia* 57 (2003) 485-91.
- [172] L Rizzo, H Selcuk, A Nikolaou, V Belgiorio, M Bekbolet, S Meric: Formation of chlorinated organics in drinking water of Istanbul (Turkey) and Salerno (Italy). *Global Nest. J.* 7 (2005) 95-105.
- [173] GD Pavlogorgatos, NS Thomaidis, AD Nikolaou, TD Lekkas: Determination of Methyl Mercury in a pilot-scale activated sludge wastewater treatment plant. *Global Nest. J.* 8 (2006) 61-67.
- [174] E Zuccato, D Calamari, M Natangelo, R Fanelli: Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355 (2000) 1789-90.
- [175] PA Segura, M François, C Gagnon, S Sauvé: Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking Waters. *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 675-84.
- [176] MJ Focazio, DW Kolpin, KK Barnes, ET Furlong, MT Meyer, SD Zaugg, LB Barber, ME Thurman: A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci Total Environ* 402 (2008) 201-16.
- [177] S Zuehlke, U Duennbier, T Heberer: Investigation of the behavior and metabolism of pharmaceutical residues during purification of contaminated ground water used for drinking water supply. *Chemosphere* 69 (2007) 1673-80.
- [178] JD Cahill, ET T. Furlong, MR Burkhardt, D Kolpin, LG Anderson: Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. c1* 1041 (2004) 171-80.
- [179] T Ternes, M Bonerz, T Schmidt: Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 175-85.
- [180] M Kuster, MJdA Alda, MD Hernando, M Petrovic, J Martín-Alonso, D Barceló: Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J.Hydrol.* 358 (2008) 112-23.
- [181] SD Kim, J Cho, IS Kim, BJ Vanderford, SA A. Snyder: Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* 41 (2007) 1013-21.
- [182] MH Huber, S Lorchonen, TA Ternes, UV Gunten: Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. *Water Res.* 39 (2005) 3607-17.
- [183] M Sánchez-Polo, J Rivera-Utrilla, G Prados-Joya, MA Ferro-García, I Bautista-Toledo: Removal of pharmaceutical compounds, nitroimidazoles, from waters by using the ozone/carbon system. *Water Res.* 42 (2008) 4163-71.
- [184] MM Huber, TA Ternes, U von Gunten: Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol. *Environ Sci. Technol.* 38 (2004) 5177-89.
- [185] VK Sharma: Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere* 73 (2008) 1379-86.
- [186] D Vogna, R Marotta, A Napolitano, R Andreozzi, M d'Ischia: Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H₂O₂ and ozone. *Water Res.* 38 (2004) 414-22.

- [187] C Zwiener, FH Frimmel: Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Res.* 34 (2000) 1881-85.
- [188] M Ravina, L Campanella, J Kiwi: Accelerated mineralization of the drug Diclofenac via Fenton reactions in a concentric Photo-reactor. *Water Res.* 36 (2002) 3553-60.
- [189] T Ternes, M Meisenheimer, D Mcdowell, F Sacher, HJ Brauch, B Haist-Glude, G Press, U Wilme, N Zulei-Seibert: Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ Sci.Technol.* 36 (2002) 3855-386.
- [190] K Ikehata, NJ Naghashkar, MG El-Din: Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. *Ozone Sci Eng* 28 (2006) 353-414.
- [191] S Esplugas, DM Bila, LGT Krause, M Dezotti: Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.* 149 (2007) 631-42.
- [192] Z Yu, S Peldszus, PM Huck: Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—on activated carbon. *Water Res.* 42 (2008) 2873-82.
- [193] SA Snyder, SA Adham, AM Redding, FS Cannon, J DeCarolis, J Oppenheimer, E Wert, Y Yoon: Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202 (2007) 156-81.
- [194] C Zwiener, T Glauner, FH Frimmel: Abstracts of the workshop on pool water chemistry and health, University of Karlsruhe, Germany. <http://www.wasserchemie.unikarlsruhe.de>. (2003).
- [195] C Zwiener, SD Richardson, DM DeMarini, T Grummt, T Glauner, FH Frimmel: Drowning in Disinfection Byproducts? Assessing Swimming Pool Water. *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 363-72.
- [196] USEPA: Alternative disinfectants and oxidants guidance manual. EPA 815-R-99-014 (1999).
- [197] S Sorlini, C Collivignarelli: Trihalomethane formation during chemical oxidation with chlorine, chlorine dioxide and ozone of ten Italian natural waters. *Desalination* 176 (2005) 103-11.
- [198] M Belluati, E Danesi, G Petrucci, M Rosellini: Chlorine dioxide disinfection technology to avoid bromate formation in desalinated seawater in potable waterworks., *Desalination* 203 (2007) 312-18.
- [199] G Hua, DA Reckhow: Comparison of disinfection byproduct formation from chlorine and alternative disinfectants. *Water Res.* 41 (2007) 1667-78.
- [200] D Gates: The chlorine dioxide handbook. American Water Works Association, Denver. (1998).
- [201] Chen, J., Regli, S. Disinfection practices and pathogen inactivation in ICR surface water plants. In: McGuire, M.J., McLain, J.L., Obolensky, A. (Eds.), Information collection rule analysis data. Awwa Research Foundation and American Water Works Association. (2002) 371–94.
- [202] USEPA: Stage 1 Disinfectants and disinfection byproduct rule, -63, FR 69390-476. (1998).
- [203] G Gordon, AA Rosenblatt: Chlorine dioxide: the current state of the art. *Ozone Sci. Eng.* 27 (2005) 203-07.
- [204] JL Huang, L Wang, NQ Ren, F Ma: Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.* 31 (1997) 607-13.
- [205] CH King, EB Shotts, RE Wooley, KG Porter: Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 3023-33.
- [206] U Zszezysk, RU Zszezysk, W Manz, KH Schleifer: Microbiological safety of drinking water. *Ann. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 81-127.
- [207] LV Venczel, M Arrowood, M Hurd, MD Sobsey: Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Clostridium perfringens* spores by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997).
- [208] RA Ahmad, E Lee, ITL Tan, AG Mohamad-Kamel: Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. *Water Res.* 31 (1997) 3132-36.
- [209] SWHO Bella, TY Tam: *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage contaminated river waters. *Water Res.* 32 (1998) 2860-64.
- [210] DG Korich, JR Mead, MS Madore, NA Sinclair, CR Sterling: Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium* viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1423-28.
- [211] JJ Cerda: Giardiasis. *Am. Family Physician* 28 (1983) 199-203.
- [212] EL Jarroll, AK Bingham, EA Meyer: Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1981) 483-87.
- [213] EW Rice, JC Hoff, FW Schaeffer III.: Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 250-51.
- [214] KH Baker, DS Herson: Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. *Water Environ. Res.* 71 (1999) 530-51.
- [215] JA Ibanez, MI Litter, RA Pizarro: Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae*. Comparative study with other Gram bacteria. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 157 (2003) 81-85.
- [216] N Kashige, Y Kakita, Y Nakashima, F Mياke, K Watanabe: Mechanism of the photocatalytic Inactivation of *Lactobacillus casei* Phage PL-1 by titania thin film. *Curr. Microbiol.* 42 (2001) 184-89.
- [217] RJ Watts, S Kong, MP Orr, GC Miller, BE Henry: Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. *Water Res.* 29 (1995) 95-100.
- [218] H Ryu, D Gerrity, JC Crittenden, M Abbaszadegan: Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Res.* 42 (2008) 1523-30.
- [219] M Sökmen, AA Serpil Deglerli: Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. *Exp. Parasitol.* 119 (2008) 44-48.
- [220] A Makowski, W Wladyslaw: Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and. Unicellular algae and photocatalytic degradation of the cells of selecte. *Curr. Top. Biophys.* 25 (2001) 19-25

- [221] MFJ Dijkstra, A Michorius, H Buwalda, HJ Panneman, JGM Winkelman, AACM Beenackers: Comparison of the efficiency of immobilized and suspended systems in photocatalytic degradation. *Catal. Today* 66 (2001) 487-94.
- [222] O Carp, CL Huisman, A Reller: Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progr. Solid State Chem.* 32 (2004) 33-177.
- [223] AG Rincón, C Pulgarin: Photocatalytic inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Appl. Catal. B: Environ.* 44 (2003) 263-84.
- [224] JC Ireland, P Klostermann, EW Rice, C R.M.: Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 1668-70.
- [225] DM Blake, P Maness, Z Huang, EJ Wolfrum, J Huang: Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Sep. Purif. Methods* 28 (1999) 1-50.
- [226] I Toshihiro, Y Hiroyuki, H Yoshikatsu, T Fujii, T Nagasawa: A general process for in situ formation of functional surface layers on ceramics. *Nature* 416 (2002) 64-66.
- [227] S Naskar, SA Pillay, M Chanda: Photocatalytic degradation of organic dyes in aqueous solution with TiO₂ nanoparticles immobilized on foamed polyethylene sheet. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 113 (1998) 257-64.
- [228] ME Fabiyi, RL Skelton: Photocatalytic mineralisation of methylene blue using buoyant TiO₂-coated polystyrene beads. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 132 (2000) 121-28.
- [229] P Fu, Y Luan, X Dai: Preparation of activated carbon fibers supported TiO₂ photocatalyst and evaluation of its photocatalytic reactivity. *J. Mol. Catal. A Chem.* 221 (2004) 81-88.
- [230] A Blazkova, I Csolleova, V Brezova: Effect of light sources on the phenol degradation using Pt/TiO₂ photocatalysts immobilized on glass fibers. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 113 (1998) 251-56.
- [231] Kim, D Hyun, T Iyoda, K Hashimoto, A Fujishima: Activity, and hardness of supported TiO₂ films on Pyrex and soda-lime glass in photocatalytic degradation of formic acid for 50 Days. *J. Adv. Oxid. Technol.* 3 (1998) 134-37.
- [232] J-M Herrmann, H Tahiri, Y Ait-Ichou, G Lassaletta, AR Gonzalez-Elipse, A Fernandez: Characterization and photocatalytic activity in aqueous medium of TiO₂ and Ag-TiO₂ coatings on quartz. *Appl. Catal. B: Environ.* 13 (1997) 219-28.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general estudiar la interacción de la materia orgánica del agua, natural o antropogénica, con cloro y/o dióxido de cloro, así como evaluar la eficacia de desinfección de un sistema fotocatalítico basado en dióxido de titanio.

2.2 Objetivos específicos

Dentro del contexto del estudio de los parámetros de calidad del agua relacionados con la materia orgánica disuelta y microorganismos los objetivos específicos del presente trabajo son los que se detallan a continuación.

1. Caracterizar de la materia orgánica disuelta del río Turia a fin de conocer cuáles son los principales componentes que actúan como precursores de trihalometanos durante el proceso de potabilización por cloro.
2. Estudiar la formación de trihalometanos en la cloración de disoluciones modelo de carbohidratos así como la influencia del pH, de la presencia de bromuro y de cloruro en los niveles de THMs formados.
3. Estudiar la influencia de la presencia de calcio y magnesio en la formación de trihalometanos empleando disoluciones de compuestos modelo así como usando agua del río Turia.
4. Estudiar la interacción del dióxido de cloro como agente desinfectante con contaminantes emergentes en las aguas potables a partir de disoluciones modelo de antibióticos β -lactámicos (penicilina, amoxicilina y cefadroxil). Estudio de la influencia del pretratamiento con dióxido de cloro en la formación de trihalometanos a partir de dichos antibióticos.
5. Estudiar los mecanismos de reacción del dióxido de cloro con tres aminoácidos (triptófano, tirosina e histidina) a partir de disoluciones modelo. Estudio de la influencia del pretratamiento con dióxido de cloro en la formación de trihalometanos a partir de dichos amino ácidos.
6. Estudiar la eficacia en la inactivación de *Cryptosporidium Parvum* y *Giardia Lamblia* mediante el empleo de un sistema fotocatalítico conteniendo un fotocatalizador de dióxido de titanio.

Capítulo 3

**Análisis de la materia orgánica
disuelta del río Turia. Combinación
para el análisis de técnicas
espectroscópicas y de derivatización
química por sililación.**

3.1 Introducción

Como se ha comentado en capítulo de Introducción hay una creciente preocupación social sobre la importancia de la mejora de la calidad química y organoléptica del agua potable y el impacto de esta calidad en la salud humana ^{1,2}. Un enfoque científico sólido hacia la mejora de la calidad del agua requiere un profundo conocimiento de la composición química de los recursos acuáticos naturales y de cómo estos compuestos sufren modificación y generan subproductos indeseados empleando agentes desinfectantes en el proceso de potabilización ^{3,4}. En este sentido, las regulaciones legales ^{5,6} sobre la presencia en el agua potable de cantidades detectables de compuestos indeseables y nocivos, son cada vez más estrictas.

El análisis de los recursos acuáticos naturales y la determinación del mayor número posible de estructuras químicas de los componentes de los mismos puede servir no sólo para evaluar la idoneidad desde el punto de vista químico de los recursos para el consumo humano, sino también puede constituir la base para el diseño nuevas estrategias para la mejora de la calidad del agua ⁷. Así, el conocimiento de la presencia de determinados tipos compuestos podría conducir al desarrollo de procedimientos para su captura y separación selectiva evitando sus efectos negativos y la formación de SPDs ⁸.

Tal y como se ha venido comentando la materia orgánica presente en los recursos naturales desempeña en general un efecto negativo sobre la calidad del agua, como mínimo porque debido al proceso de cloración los compuestos orgánicos son precursores de THMs y de otras moléculas orgánicas cloradas ⁹⁻¹².

El cloro es por ley ¹³ el agente desinfectante encargado de evitar la proliferación de microorganismos; sin embargo, por reacción del cloro con la MOD en el agua natural forma THMs, cuya concentración en el momento de la ingesta debe ser inferior a un límite legal (100 y 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la UE y EEUU, respectivamente) ^{5,6}.

Está generalmente aceptado que los compuestos orgánicos presentes en las aguas naturales son moléculas muy complejas ¹⁴⁻¹⁸. En la sección 1.3 se ha descrito con detalle los tipos de materia orgánica presente en aguas naturales.

En relación con la composición química de la materia orgánica, hay algunos procedimientos generales para concentrar y separar los compuestos orgánicos en

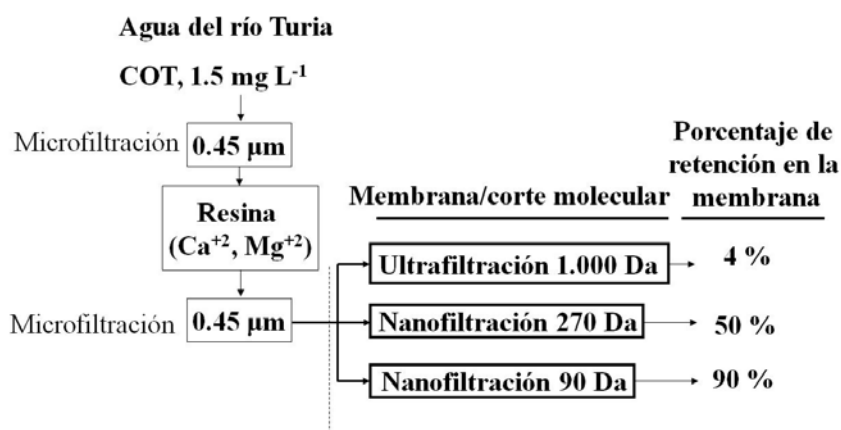
diferentes fracciones. Básicamente, estos procedimientos consisten en el empleo de ultrafiltración^{19,20}, ósmosis inversa²¹⁻²³, resinas de intercambio iónico^{24,25} y resinas adsorción tales como las denominadas con las siglas XAD²⁶⁻²⁸.

En contra de los paradigmas actuales ampliamente aceptados sobre la composición y complejidad estructural de la materia orgánica natural presente en los recursos acuáticos²⁹⁻³⁶, el estudio analítico de los compuestos orgánicos presentes en el agua del río Turia que se va a comentar aquí indica que éste no es el caso del agua del río objeto de estudio. El río Turia constituye el recurso hídrico natural para abastecer de agua potable a Valencia y su área metropolitana comprendiendo una población total unos 1.500.000 de consumidores.

Los datos obtenidos en este estudio, demuestran la casi total ausencia de ácidos húmicos y fúlvicos en el río Turia, siendo los componentes prevalentes sacáridos de bajo peso molecular acompañados por oligopéptidos y ácidos grasos. Además, mostraremos que los procedimientos de fraccionamiento convencionales comúnmente empleados para el análisis de aguas naturales están lejos de separar los componentes en fracciones químicamente diferenciables.

3.2. Procedimiento de concentración

En el Capítulo Experimental se describen en detalle los pasos seguidos para la concentración de la MOD del río Turia. El Esquema 3.1 muestra las etapas que se han llevado a cabo y el porcentaje de carbono orgánico disuelto (COD) retenido en función del tamaño de corte de la membrana de filtración empleada.



Esquema 3.1. Concentración de la MOD empleando una planta de filtración por membranas. Las muestras de agua se tomaron en el período Junio-Julio del 2006.

Inicialmente, se empleó una membrana con un peso molecular de corte de 1.000 Da (Esquema 3.1). Inesperadamente ésta sólo condujo a una pequeña concentración del COD (4 %). Este hecho indica que la mayoría de la materia orgánica del río Turia tiene un peso molecular por debajo de 1.000 Da. Este hecho inesperado descarta claramente la presencia en el agua del río Turia de ácidos húmicos y fúlvicos cuyo peso molecular es muy superior a 1.000 Da. A fin de aumentar la retención del COD se siguió la misma metodología pero empleando una membrana de nanofiltración con un peso molecular de corte de 270 Da (Esquema 3.1). El uso de esta membrana de nanofiltración condujo a un aumento en la retención del COD respecto a la membrana de 1.000 Da, del 4 al 50%. Este valor también indica que con un corte molecular 270 Da un porcentaje significativo del COD (alrededor del 50%) pasa a través de la membrana (permeado) y no se retiene en el concentrado.

Con el fin de lograr una concentración más eficiente de la materia orgánica sin discriminar los componentes de bajo peso molecular, fue necesario utilizar una membrana con un peso molecular de corte de 90 Da (Esquema 3.1). Este peso molecular de corte corresponde al menor tamaño que puede aplicarse en nuestro sistema de nanofiltración. Trabajando en estas condiciones y basándonos en la concentración inicial del COD, pudo finalmente retenerse en el concentrado un 90% del COD presente en el agua cruda, mientras que el volumen se redujo de 1.000 a 17 L. El Esquema 3.1 resume los resultados obtenidos con las tres membranas empleadas de filtración dependiendo del peso molecular de corte de cada una de ellas. En general, los resultados obtenidos con las diferentes membranas claramente indican que el COD de este recurso natural tiene un peso molecular bajo, estando alrededor del 50% del COD en el rango entre 270 y 90 Da. Esto excluye la presencia de los ácidos húmicos y fúlvicos que es conocido que poseen un peso molecular elevado como los componentes predominantes de la MOD del río Turia.

3.3 Procedimiento de fraccionamiento

Después de concentrar la materia orgánica disuelta más de 50 veces por nanofiltración del agua del río Turia, el concentrado obtenido se sometió a un fraccionamiento siguiendo el procedimiento convencional descrito por Thurman y Malcolm²⁸ (ver Capítulo 9). La Tabla 3.1 resume el origen de las cuatro fracciones obtenidas así como el porcentaje de éstas respecto al COD inicial. La fracción HPO-A es la más importante en términos de COD, seguida por TPI-A, HPI-A y HPO-N.

Tabla 3.1. Nombre, procedimiento de recuperación y porcentaje respecto al COD inicial de las fracciones obtenidas en el proceso de fraccionamiento del agua del río Turia.

Fracción	Columna	Elución	Porcentaje de COD (%)
Hidrófoba (HPO-A)	Retenida en DAX8	1) Adsorbida en DAX8 2) Eluída con NaOH (0.1 M)	50
Neutra (HPO-N)	Retenida en DAX8	1) Adsorbida en DAX8 2) No eluída con NaOH 3) Eluída con MeOH	12
Transfílica (TPI-A)	No retenida en DAX8 Retenida en XAD4	1) No adsorbida en DAX8 2) Adsorbida en XAD4 3) Eluída con NaOH (0.1M).	24
Hidrofílica (HPI-A)	No retenida en DAX8 ni en XAD4	1) No adsorbida en DAX8 ni en XAD4. 2) Concentrada bajo vacío a baja temperatura (40°C)	14
Total			100%

Como muestra la Tabla 3.1, se ha seguido el protocolo recomendado para el fraccionamiento de la materia orgánica presente en el concentrado de nanofiltración obtenido a partir del agua de río Turia^{27,28}. Los resultados que comentaremos más adelante indican claramente que los procedimientos convencionales para el fraccionamiento de la materia orgánica son insatisfactorios para el agua del río Turia. Esta conclusión se destacará igualmente después de comentar los detalles de caracterización de las diferentes fracciones. De esta manera y según la Tabla 3.1 hemos obtenido cuatro fracciones, que aunque se denominan según la literatura con nombres como hidrófoba (HPO-A), neutra (HPO-N), transfílica (TPI-A) e hidrofílica (HPI-A), realmente presentan características espectroscópicas muy similares (ver abajo). Incluso, el análisis de cromatografía de gases (CG) de los derivados sililados muestra una distribución de productos similar (ver puntos 3.2.5. y 3.2.6). Por motivos de brevedad y debido a las similitudes entre las cuatro fracciones, se llevará a cabo una discusión conjunta de sus datos espectroscópicos.

De todas las fracciones, se ha registrado el espectro de resonancia magnética y nuclear de protón en estado líquido (RMN-¹H), el espectro de RMN de ¹³C en estado sólido (RMN-¹³C) así como los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF), los análisis elementales (carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre) y los espectros de masas (ESI-MS, ESI-MS/MS y MALDI-TOF-MS), de las muestras equilibradas a temperatura ambiente. También se han realizado los espectros de masas después de derivatizar las

muestras mediante siliación con y sin hidrólisis previa de las mismas. Finalmente, se realizó una hidrólisis ácida para la determinación del contenido en aminoácidos en cada una de las muestras.

3.4 Análisis elemental

Los análisis químicos de combustión de las muestras permiten determinar el porcentaje de C, N, H y S. Los resultados se recogen en la Tabla 3.2. Además de variaciones en el porcentaje, las características más destacadas son la gran cantidad de oxígeno y la detección de cantidades significativas de nitrógeno y de azufre. Los compuestos naturales típicos nitrogenados son los aminoazúcares, los péptidos y las combinaciones de bases nitrogenadas. Con respecto al azufre, parece más razonable que el alto porcentaje corresponde a detergentes sulfonados y/o sulfónicos introducidos antropogénicamente. Por otra parte, una parte del contenido de azufre puede corresponder a aminoácidos o péptidos azufrados.

Tabla 3.2. Análisis elemental de combustión de las cuatro fracciones provenientes del concentrado del agua del río Turia tras intercambio iónico con resina aniónica.

	% en peso				Razón atómica molar		
	N	C	H	S	N/C	H/C	S/C
HPO-A	0.99	21.53	2.62	0.22	0.039	1.458	0.004
TPI-A	0.23	14.58	2.08	0.09	0.013	1.715	0.002
HPO-N	0.45	17.66	2.29	0.27	0.022	1.558	0.006
HPI-A	0.65	19.34	2.40	0.87	0.029	1.488	0.017

Es pertinente destacar que la razón H/C de las sustancias húmicas donde predominan las unidades aromáticas está alrededor de 1.0³⁷. Por otra parte la relación H/C de los sacáridos se aproxima a 2. Los resultados experimentales para las fracciones del río Turia muestran valores de H/C comprendidos entre estos dos límites. Por lo que respecta a la razón N/C los valores comunes para las sustancias húmicas y fúlvicas son de alrededor de 0.03 a 0.01, respectivamente³⁷. Finalmente destaca el valor de la razón S/C de la fracción HPI-A (0.017). Este valor sugiera que dicha fracción está constituida por compuestos hidrofílicos con funcionalidades del tipo sulfonatos (R-SO₃⁻) de origen antropogénico a través principalmente de detergentes.

3.5 Estudio espectroscópico

Los espectros de IR-TF se registraron a temperatura ambiente y bajo condiciones ambientales. Previamente las muestras se deshidrataron en una estufa a 40 °C durante 24 h. La Figura 3.1 muestra los espectros de IR-TF obtenidos para cada una de las cuatro fracciones. En esta Figura, se han señalado los números de ondas (cm^{-1}) correspondientes a las bandas más relevantes. Como puede verse, los cuatro espectros muestran similitudes (presencia de grupos -OH y C=O) y diferencias. Además, un estudio detallado de algunas regiones de los espectros (véase, por ejemplo, de 1.800 a 1.600 cm^{-1}) muestran claramente una variación gradual de las características espectroscópicas.

Así, por ejemplo mientras la fracción HPO-A tiene principalmente un grupo carboxílico a 1.728 cm^{-1} , este pico está también presente en las fracciones HPO-N y TPI-A acompañada de otras bandas que aparecen sobre 1.645 cm^{-1} . Dada la complejidad de la mezcla presente en las aguas naturales y las fases estacionarias de las resinas, éster acrílico (Supelita DAX8) y de poliestireno divinilbenceno (Amberlita XAD-4), no es razonable esperar que el fraccionamiento basado en estas resinas sea más eficiente. En general todas las fracciones HPO-A, TPI-A and HPO-N tienen: 1) vibraciones de -OH desde 3.700 cm^{-1} a 2.500 cm^{-1} ; 2) vibraciones de tensión de C=O alrededor de 1.730 cm^{-1} ; y 3) vibraciones de C-O alrededor de 1.200-1.000 cm^{-1} . Con respecto a los grupos -OH, se observaron algunas diferencias significativas en cuanto a la forma y a la posición de las bandas. Excepto para la fracción HPI-A, estas bandas de -OH no puede atribuirse exclusivamente a agua absorbida presente en las muestras ya que además de los grupos -OH en la región 3.600-3.000 cm^{-1} , no se observa o es muy débil la segunda banda característica del agua a 1.620 cm^{-1} en comparación con la banda de -OH entre 3.500-2.500 cm^{-1} . Por tanto, excepto para la fracción HPI-A, probablemente las bandas de estiramiento de -OH observadas en los espectros de IR-TF se deben a los grupos hidroxilos presentes en las moléculas orgánicas que forman parte de la MOD.

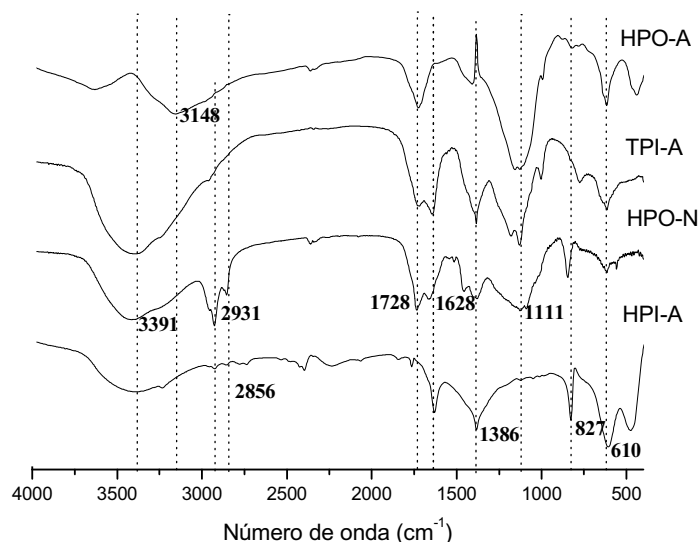


Figura 3.1. Espectros de IR-TF de las diferentes fracciones aisladas del río Turia.

Con respecto a las bandas de vibración de C=O, se registraron dos picos diferentes alrededor de 1.728 cm^{-1} y 1.628 cm^{-1} los cuales pueden asignarse a grupos carboxílicos y de amida, respectivamente. Como puede verse en la Figura 3.2 algunas de las fracciones (HPO-A, TPI-A y HPO-N) muestran predominantemente bandas de grupos carboxílico, mientras que la de amida es claramente observable en las fracciones TPI-A y HPO-N. Respecto a la vibración de tensión del enlace simple de C-O que aparece alrededor de 1.150 cm^{-1} , esta banda está presente en las fracciones HPO-A, TPI-A y HPO-N.

La Tabla 3.3 resume las características principales de los espectros de IR-TF de las cuatro fracciones provenientes del concentrado del río Turia.

Tabla 3.3. Resumen de las bandas de IR-TF y de su intensidad registradas para las cuatro fracciones del río Turia.

Fracción	Grupo funcional		
	OH	C=O	C-O
HPO-A	ácido carboxílico	carboxílico	muy intensa
TPI-A	ácido carboxílico	carboxílico y amida	intensa
HPO-N	alcohol	carboxílico y amida	media
HPI-A	no intensa	ausencia	ausencia

A fin de conseguir más información acerca del tipo de compuestos presentes en cada fracción, también se registró el espectro de RMN- ^1H en disolución de las fracciones en metanol deuterado (Figura 3.3). De estos espectros, queda claro que la cantidad de protones aromáticos es muy pequeña con respecto a los hidrógenos alifáticos. En las sustancias húmicas el porcentaje de protones aromáticos oscila alrededor del 18 % ³⁷, mientras, por el contrario la fracción HPO-A obtenida del río Turia, donde supuestamente deberían estar las sustancias húmicas, apenas tiene un 1% de protones aromáticos. Además, los protones fenólicos deberían aparecer a desplazamientos químicos por debajo de 7 ppm mientras que en nuestro caso los protones aromáticos claramente aparecen por encima de 7 ppm.

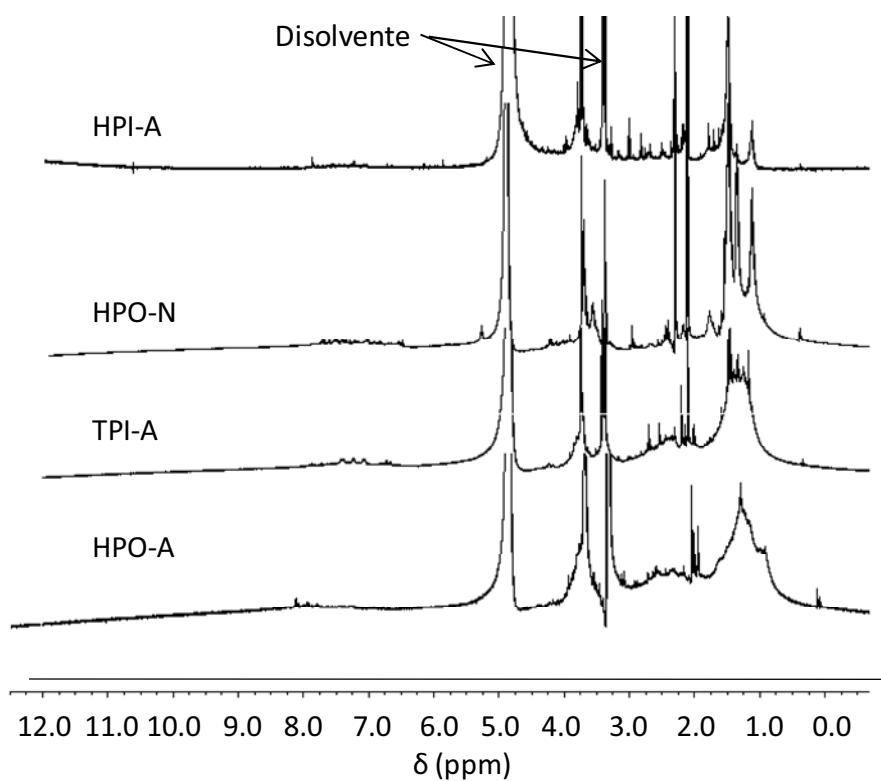


Figura 3.3. Espectros de RMN- ^1H de las cuatro fracciones provenientes del concentrado del río Turia en CD_3OD .

Por el contrario, la región entre 3 y 4 ppm correspondiente a hidrógenos enlazados a átomos de carbono junto a átomos de oxígeno muestra señales de gran intensidad. En la parte superior de esta región se observaron picos agudos de gran intensidad. Estas señales intensas pueden asignarse a grupos $-\text{OCH}_3$, mientras que la señal ancha entre 3 y 4 ppm

se puede asignar a protones del tipo H-C-O acoplados formando parte de compuestos cíclicos.

El espectro de RMN-¹H también muestra señales entre 2.6 y 2 ppm. Estos hidrógenos son atribuibles a hidrógenos en posición α a C=O o a enlaces insaturados C-C. Como se ha comentado antes, los singletes agudos entre 1.8 y 2.0 ppm indican la presencia de grupos metilo unidos a -C=O ó -C=C-. Por último, las señales entre 1.5 y 0.8 ppm se asignan a hidrógenos alifáticos. Un resumen de las asignaciones de los picos y de las áreas de los mismos para cada una de las fracciones se recoge en la Tabla 3.4.

En general, el espectro de RMN-¹H muestra un porcentaje pequeño de hidrógenos aromáticos, la presencia de un porcentaje elevado de hidrógenos unidos a C-O, en posición α a C=O ó -C=C- y cadenas alifáticas. Los grupos metilo se observan para cada tipo de señales. La proporción entre estos tres tipos de hidrógeno varía dependiendo de la fracción.

Tabla 3.4. Proporción de hidrógenos no intercambiables determinados a partir del espectro de RMN-¹H de las fracciones y su asignación.

δ (ppm)	Asignación	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
		Porcentaje relativo (%)			
0,5-1,9 1,9-3,1	Alifáticos vecinos a grupos insaturados/ carbonilos/aromáticos/dobles enlaces	33,4	52,1	61,0	28,4
3,1-4,6	HC-O	29,4	25,0	14,0	28,1
4,7-6,0	Acetal	36,1	17,2	15,2	39,8
6,0-9,0	Aromáticos	0,0	0,0	2,4	0,3
		1,0	5,7	7,3	3,7

Las conclusiones anteriores son compatibles con los espectros de RMN-¹³C en estado sólido. La Figura 3.4 muestra los espectros de RMN-¹³C de las cuatro fracciones. En esta figura, se han señalado los desplazamientos químicos de las señales más relevantes. Como puede verse, la presencia de señales correspondiente a grupos carboxilatos (172 ppm), carbonos unidos a oxígeno (71 y 52 ppm) y carbonos alifáticos (22 ppm) son claramente visibles. En cuanto a los carbonos aromáticos, las bandas de rotación lateral de los picos de carboxilato aparecen en esta región y han sido marcadas con un asterisco. El hecho de que se trata de bandas de rotación lateral de la señal de los carbonos de los carboxi se confirmó registrando espectros de RMN-¹³C adicionales a diferentes velocidades de giro de la sonda. Algunas de las fracciones muestran un pico a 123 ppm que no es debido a bandas de giro y que podría ser atribuible a anillos aromáticos. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente para el espectro de RMN-¹H en disolución, esta banda es pequeña comparada por ejemplo con la señal de los grupos carboxilatos. Por lo tanto,

alternativamente la banda a 123 ppm también podría ser asignada a dobles enlaces $-C=C-$ olefínicos.

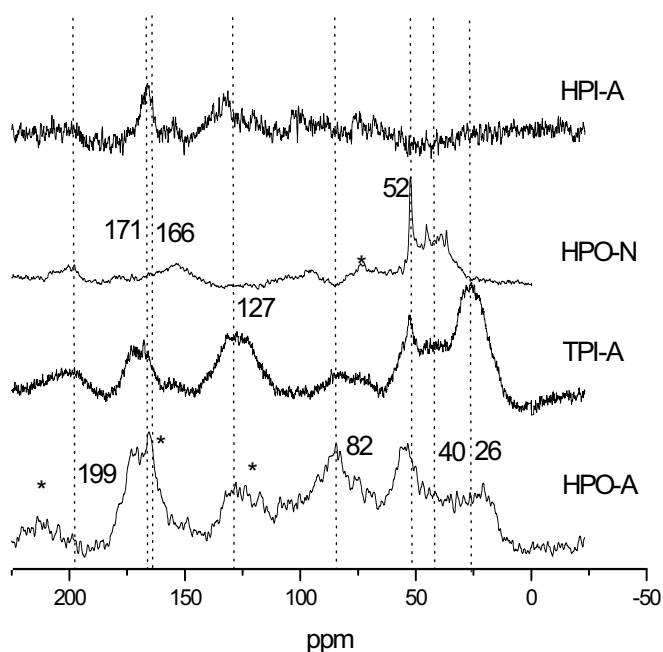


Figura 3.4. Espectro de RMN- ^{13}C en estado sólido de las cuatro fracciones del río Turia. Los asteriscos indican las bandas de rotación lateral confirmadas registrando los espectros a diferentes velocidades de giro.

La Tabla 3.5 muestra la asignación de las regiones del espectro de RMN- ^{13}C para las cuatro fracciones aislada así como el porcentaje relativo de cada una de las zonas.

Tabla 3.5. Tipos de carbono registrados en RMN- ^{13}C en estado sólido para cada una de las fracciones obtenidas del río Turia.

δ (ppm) rango	Asignación	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
		Intensidad relativa (%)			
0-47	alifático	33,8	42,9	33,9	4,1
47-90	heteroátomo	7,4	4,7	26,4	13,8
90-108	O-C-O	13,2	14,2	0,7	12,7
108-145	aromático	3,0	17,6	23,4	38,3
	olefínico				
145-167	C_aromático-O,N	12,5	9,0	8,1	27,8
167-187	(C=O)-X-	20,9	1,3	6,1	1,3
187-220	cetona, aldehído	9,1	10,3	1,4	2,0

3.6 Análisis de compuestos orgánicos por derivatización

Las observaciones anteriores sobre los espectros de IR-TF, RMN-¹H y RMN-¹³C de las cuatro fracciones dan información útil sobre el tipo de compuestos presentes en el agua bruta, aunque no dan ninguna indicación de los compuestos individuales y de sus porcentajes en la mezcla. Con el fin de identificar el máximo número de compuestos individuales que pudiesen estar presentes en cada una de las fracciones, procedimos a realizar la derivatización de cada fracción por sililación e inyectar la mezcla en un CG-MS. La comparación de los espectros de masas (MS) adquiridos para los derivados de trimetilsililo (TMS) de los compuestos presentes en el agua, con los de la librería de masas (NIST98) proporciona la primera información sobre la identidad de los componentes individuales de cada fracción. Para confirmar la estructura propuesta sugerida por comparación de los espectros de masas, se sometió a muestras auténticas de estos compuestos, cuando estaban disponibles comercialmente, a la derivatización por sililación en las mismas condiciones que las fracciones, y se inyectaron estos derivados sililados en el CG-MS. Las Tablas 3.6-3.9 muestran la estructura de los componentes propuestos en cada una de las fracciones, distinguiendo los casos en donde la identificación fue segura, hecha por comparación del tiempo de retención y del MS con muestras auténticas de los compuestos, con aquellos otros casos en que la estructura propuesta está basada exclusivamente en la comparación del espectro de masas con los de librería de masas (NIST98). En este último caso, se indica el porcentaje de coincidencia respecto a la librería para cada compuesto seguido tras las siglas CL haciendo referencia a *coincidencia con la librería*.

El estudio detallado de las estructuras mostradas en estas Tablas indica que aunque el procedimiento de fraccionamiento no es perfecto y hay compuestos comunes en varias fracciones, se dan algunas tendencias características distintivas de las diferentes fracciones. Así pues, la fracción denotada como HPO-A contiene predominantemente compuestos polihidroxílicos principalmente con estructura de monosacárido. La lista incluye pentosas (arabinosa, fructosa, ribosa, xilosa), hexosas (galactosa, glucosa, talosa) en forma abierta o hemicetal. Además, también se caracterizaron algunos α -metil-glicósidos. Además, también se observaron compuestos polihidroxílicos, ácidos grasos, monoglicéridos y ácidos carboxílicos de cadena corta.

En contraste, a la composición de la fracción HPO-A, compuesta principalmente por monosacáridos, la fracción TPI-A está compuesta predominantemente por ácidos carboxílicos bien de cadena alquílica larga (ácidos grasos) o con otros grupos funcionales además de -COOH. Como comentario general, parece que debido a la presencia de los

grupos carboxílicos puede aceptarse que la polaridad de la fracción TPI-A es superior a la de la fracción HPO-A, donde los principales componentes son alcoholes polihidroxílicos.

A este respecto, el grupo carboxílico presente en muchos de los compuestos caracterizados en la fracción TPI-A hace comprensible los términos utilizados para denotar las fracciones aunque todos ellos son obviamente solubles en agua. Estos ácidos carboxílicos presentes en la fracción TPI-A serían los responsables de la banda estiramiento en el IR-TF desde 3.500 a 2.800 cm^{-1} , así como del pico 172 ppm en RMN- ^{13}C espectroscopia y de los protones de 2.8 a 1.9 ppm en el espectro de RMN- ^1H .

Las fracciones obtenidas después de eliminar los compuestos de las fracciones HPO-A y TPI-A dieron lugar, después de sililación e inyección en el CG-MS, a unos pocos compuestos. Estos productos son, en el caso de la fracción HPO-N, ácidos grasos metilados acompañados por monoglicéridos y ácidos grasos libres (Tabla 3.8). Además, en dicha fracción se detectó la presencia de paracetamol cuyo origen es de contaminación antropogénica. Más tarde volveremos a comentar la composición de la fracción HPO-N cuando se presenten los productos observados después de la derivatización de la muestra hidrolizada. Una situación similar, es decir, pocos productos observados por CG-MS tras la sililación, se produce también en la fracción HPI-A donde únicamente se detectaron el ácido oxálico y el ácido malónico (ver Tabla 3.9).

En general, la distribución de productos mostrada en las Tablas 3.6-3.9 es consistente con el corte molecular de la membrana de nanofiltración empleada para el agua del río Turia, y con el peso molecular relativamente bajo de muchos de los productos identificados. Como se indicó anteriormente, empleando una membrana de corte molecular de 270 Da, el 50% del COD no es retenido en el concentrado, indicando que de forma inesperada hay un gran porcentaje de compuestos de bajo peso molecular.

Tabla 3.6. Compuestos caracterizados y propuestos en base al CG-MS después de sililación para la fracción HPO-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra) en base al área cromatográfica del pico.

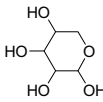
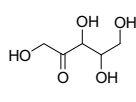
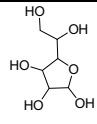
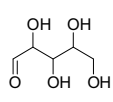
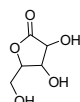
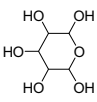
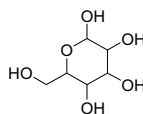
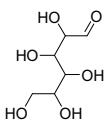
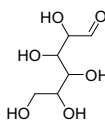
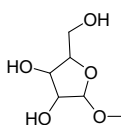
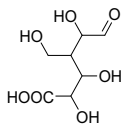
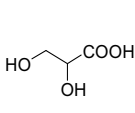
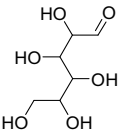
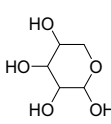
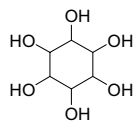
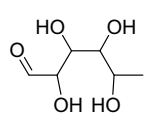
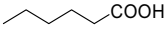
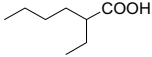

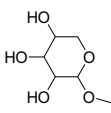
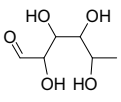
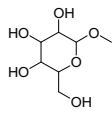
					
arabinosa (8.8)	fructosa (7.3)	galactofuranosa (6.3)	ribose (6.6)	lactona del ácido ribónico (13.6)	glucopiranososa (6.2)
					
galactopiranososa (4.6)	glucosa (3.5)	galactosa (4.6)	tetrahidro-2-(hidroximetil) -5-metoxifuran-3,4-diol (CL, 87) (0.9)	ácido glucurónico (CL, 89) (1.3)	
					
ácido glicérico (1.1)	talosa (28.1)	xilopiranososa (5.7)	mio-inositol (9.7)	fucosa (11.5)	
			$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{-COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{-COOH}$	
ácido hexanoico (0.2)	ácido 2-etilhexanoico (1.1)	ácido 2-hidroxibenzoico (1.5)	ácido palmítico (3.7)	ácido esteárico (4.5)	
					
tetrahidro-2-metoxi-2H- piran-3,4,5-triol (CL, 86) (3.2)	2,3,4,5-tetrahidroi-hexanal (CL, 82) (2.4)	tetrahidro-2-(hidroximetil)-6- metoxi-2H-piran-3,4,5-triol (CL, 90) (1.7)			
Total identificado: $138.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra					

Tabla 3.7. Compuestos caracterizados y propuestos en base al CG-MS después de siliación para la fracción TPI-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

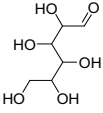
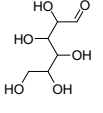
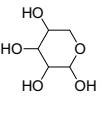
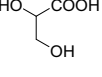
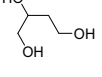
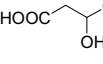
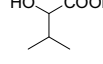
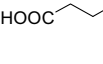
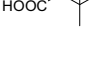
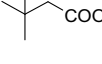
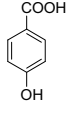

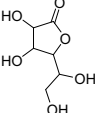
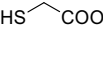
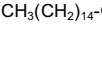
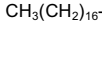
				
talosa (28.1)	glucosa (2.3)	xilopiranososa (5.7)	ácido glicérico (1.1)	1,2,4-butanodiol (CL, 96) (0.4)
				
ácido 2-hidroxisuccínico (CL, 92) (2.2)	ácido 2-hidroxi-3-metilbutanoico (CL, 83) (0.4)	ácido succínico (CL, 91) (3.0)	ácido 3,3-dimetilpentanodioico (CL, 97) (5.3)	ácido 3-hidroxipentanoico (CL, 84) (2.3)
				
ácido 4-hidroxibenzoico (2.7)	ácido 2-hidroxi-3-metilbenzoico (MC, 81) (1.3)	lactona del ácido altrónico (MC, 91) (0.8)	ácido tioacético (MC, 91) (0.8)	ácido esteárico (6.2)
				
				ácido palmítico (4.3)
Total identificado: 69.2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra				

Tabla 3.8. Compuestos caracterizados y propuestos en base al CG-MS después de siliación para la fracción HPO-N. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

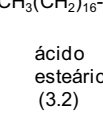
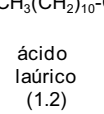
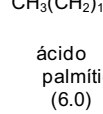
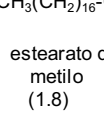
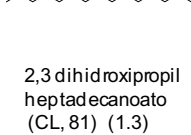
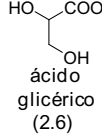
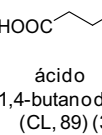
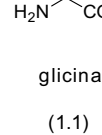
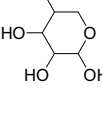
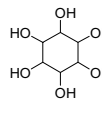
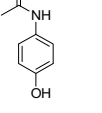
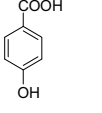
			
ácido esteárico (3.2)	ácido láurico (1.2)	ácido palmítico (6.0)	estearato de metilo (1.8)
			
2,3-dihidroxi-3-propilheptadecanoato (CL, 81) (1.3)	ácido glicérico (2.6)	ácido 1,4-butanodioico (CL, 89) (3.8)	glicina (1.1)
			
xilopiranososa (0.3)	mio-inositol (0.2)	paracetamol (4.8)	ácido 4-hidroxibenzoico (0.1)
Total identificado: 26.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra			

Tabla 3.9. Compuestos caracterizados y propuestos en base al CG-MS después de sililación para la fracción HPI-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

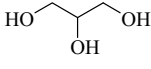
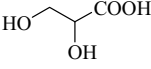
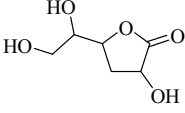
$\text{HOOC}-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
ácido oxálico (0.8)	ácido malónico (CL, 87) (0.8)
Total identificado: $1.6 \mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra	

3.7. Análisis de compuestos orgánicos tras someter las fracciones a hidrólisis y posterior derivatización

El estudio anterior de CG-MS de las fracciones después de la etapa de sililación ha permitido la identificación de un gran número de monosacáridos, ácidos carboxílicos, ésteres carboxílicos y algunos compuestos aromáticos. Sin embargo, este estudio puede ser engañoso por el hecho de que, incluso después de la sililación, algunos componentes pueden carecer de la suficiente volatilidad para ser analizados por CG.

Al parecer, este problema es más agudo en las fracciones HPO-N y HPI-A para las cuales el porcentaje en peso de los productos caracterizados en la sililación es relativamente pequeño. Con el fin de hacer frente a este problema, se procedió a la saponificación de cantidades conocidas de las fracciones seguida de sililación y análisis por CG-MS de las mezclas resultantes de la hidrólisis. El fundamento de la saponificación es hidrolizar compuestos orgánicos de alto peso molecular en sus componentes más sencillos. Así pues, después de la hidrólisis los productos resultantes tendrían menor masa molecular, por lo tanto las posibilidades para ser analizados por CG debería ser mayor. Además, la comparación entre cromatogramas antes y después de hidrólisis podría dar una idea más concreta de la composición real de cada fracción.

La hidrólisis en condiciones fuertemente básicas se llevó a cabo en autoclave a $170\text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 h utilizando NaOH (2 M) y atmósfera de nitrógeno. En estas condiciones la mayor parte de los enlaces de éster, peptídicos y glucosídicos se hidrolizan en ácidos carboxílicos, aminoácidos y monosacáridos. La característica más importante del tratamiento básico es que los sacáridos no son estables en estas condiciones. Un blanco de control con glucosa pura como compuesto modelo seguido por sililación y análisis por CG-MS demuestra la descomposición total de la glucosa con este tratamiento (ver Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Productos obtenidos tras hidrólisis de la glucosa.		
		
glicerol	ácido glicérico	lactona del ácido 3-desoxialtrónico
mezcla de estereoisómeros		

Por lo tanto, aunque la descomposición de monosacáridos simplificará la mezcla después del tratamiento básico los resultados de los análisis después de la hidrólisis deben ser considerados con precaución admitiendo la posibilidad de algunas formaciones/descomposiciones químicas más allá de la ruptura deseada de enlaces éster, amida y glucósido. Las Tablas 3.11-3.14 muestran los productos que han sido identificados en la hidrólisis y su masa correspondiente. De la inspección de dichas Tablas se puede concluir que la hidrólisis de lugar a la detección de ácidos carboxílicos tanto alifáticos como aromáticos, así como hidroxiacidos y diácidos. Además, y de acuerdo con el objetivo que se perseguía en la hidrólisis básica, el porcentaje de los productos analizado fue notablemente superior que sin hidrólisis básica previa. Sin embargo, y considerando la descomposición de la glucosa con el tratamiento empleado, es claro que los productos identificados derivan de la transformación de los compuestos originales presentes en las fracciones.

Tabla 11. Compuestos caracterizados en la hidrólisis y siliación de la fracción HPO-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

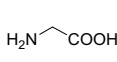
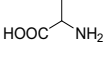


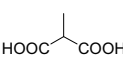
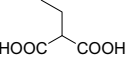
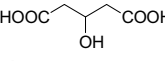
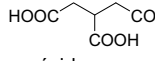
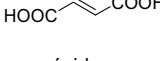
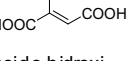
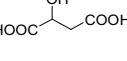
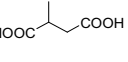
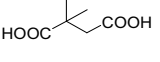
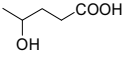
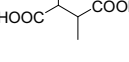




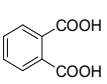



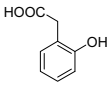
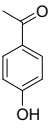
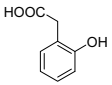
					
glicina (6.6)	alanina (0.8)	ácido 2-hidroxi butanoico (CL, 82) (14.8)	ácido 2-hidroxi pentanoico (CL, 86) (1.7)	ácido 2-metil propanodioico (CL, 91) (1.1)	ácido 2-etil propanodioico (CL, 82) (19.9)
					
ácido 3-hidroxi pentanodioico (CL, 87) (5.5)	ácido 1,3,5 propanotricarboxílico (CL, 91) (9.4)	ácido trans-butenodioico (CL, 93) (2.8)	ácido hidroxi butanodioico (CL, 85) (40.0)	ácido trans-metil butenodioico (CL, 87) (11.8)	
					
ácido metil butanodioico (CL, 89) (4.9)	ácido 1,1-dimetil butanodioico (CL, 84) (11.3)	ácido 4-hidroxi pentanoico (CL, 89) (1.1)	ácido 1,2-dimetil butanodioico (CL, 87) (2.1)	ácido benzoico (1.9)	3-carboxiamida piridina (nicotinamida) (2.6)
					
ácido 2-hidroxi benzoico (3.9)	3-carboxi piridina (CL, 86) (5.3)	ácido 1,2 bencenodioico (CL, 84) (3.7)	ácido 1,3 bencenodioico (CL, 91) (5.3)	ácido 2-metil benzoico (CL, 86) (2.2)	ácido 4-hidroxi benzoico (2.3)
					
1-(4-hidroxi fenil) etanona (CL, 83) (9.8)					
	$\text{HOOC}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	
ácido 1-(2-hidroxi fenil) acetico (CL, 81) (2.9)	ácido etanodioico (10.9)	ácido octadecanoico (esteárico) (7.6)	ácido hexadecanoico (palmitico) (11.7)	ácido tetradecanoico (mirístico) (7.4)	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$		
ácido decanoico (CL, 91) (1.0)	ácido heptadíoico (CL, 87) (5.9)	ácido hexanodioico (CL, 85) (7.8)	ácido pentanodioico (CL, 93) (9.2)		
$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$				
ácido butanodioico (CL, 87) (49.5)	ácido propanodioico (2.3)				
Total identificado: 287.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra					

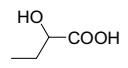
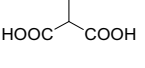
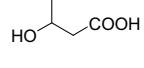
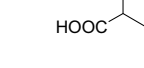
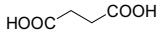
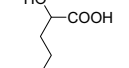
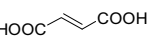
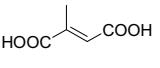
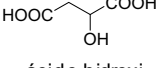
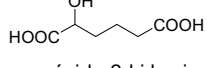
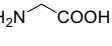
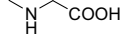
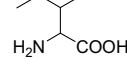

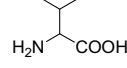
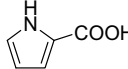






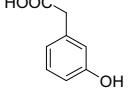
Tabla 3.12. Compuestos caracterizados en la hidrólisis y siliación de la fracción TPI-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

<chem>HOOC-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH(OH)-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH2-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH(OH)-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH(OH)-CH2-CH2-COOH</chem>
ácido etanodioico (2.7)	ácido 2-hidroxi butanoico (CL, 87) (1.4)	ácido 2-etil propanodioico (CL, 83) (0.2)	ácido hidroxi butanoico (CL, 91) (0.5)	ácido 3-hidroxi butanoico (CL, 82) (0.3)
<chem>HOOC-CH(CH3)-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH(CH3)-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH=CH-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH=CH-CH2-COOH</chem>	
ácido metil butanoico (CL, 85) (0.1)	ácido 2,3 dimetil butanoico (CL, 88) (2.1)	ácido trans butenoico (CL, 95) (2.1)	ácido trans-metil butenoico (CL, 91) (2.0)	
<chem>HOOC-CH2-CH2-CH(OH)-COOH</chem>	<chem>C1=CC=C(C(=O)O)N=C1</chem>	<chem>O=C(O)c1ccc(O)cc1</chem>	<chem>O=C(O)c1ccccc1C(=O)O</chem>	<chem>CH3(CH2)14-COOH</chem>
ácido 4-hidroxi pentanoico (CL, 86) (3.3)	3-carboxi piridina (CL, 86) (2.1)	ácido 2-hidroxi benzoico (1.7)	ácido 1,3 bencenodioico (0.3)	ácido hexadecanoico (palmitico) (0.8)
<chem>CH3(CH2)16-COOH</chem>	<chem>HOOC-(CH2)3-COOH</chem>	<chem>HOOC-(CH2)2-COOH</chem>		
ácido octadecanoico (estearico) (0.8)	ácido pentanoico (CL, 87) (0.8)	ácido butanoico (CL, 91) (0.8)		
Total identificado: 23.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra				

Tabla 3.13. Compuestos caracterizados en la hidrólisis y siliación de la fracción HPI-A. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

<chem>HOOC-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH2-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH=CH-COOH</chem>
ácido etanodioico (0.2)	ácido butanoico (CL, 97) (0.4)	ácido propanodioico (CL, 91) (0.2)	ácido trans-butenodioico (CL, 88) (4.1)
<chem>HOOC-CH(OH)-CH2-COOH</chem>	<chem>HOOC-CH(OH)-COOH</chem>	<chem>HOOC-(CH2)3-COOH</chem>	
ácido hidroxi butanoico (CL, 83) (12.4)	ácido 2-hidroxi butanoico (CL, 89) (17.5)	ácido pentanoico (CL, 84) (12.4)	
Total identificado: 37.0 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra			

Tabla 3.14. Compuestos caracterizados en la hidrólisis y siliación de la fracción HPO-N. El número entre paréntesis representa la cantidad estimada de cada compuesto en la mezcla ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra).

					
ácido 2-hidroxi butanoico (CL, 81) (6.9)	ácido metil propanodioico (CL, 88) (0.3)	ácido 3-hidroxi butanoico (CL, 83) (2.2)	ácido metil butanodioico (CL, 91) (7.7)		
					
ácido butanodioico (CL, 87) (20.7)	ácido 2-hidroxi pentanoico (CL, 81) (1.7)	ácido trans butenodioico (CL, 99) (2.6)	ácido trans-metil butenodioico (CL, 85) (4.5)		
	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$				
ácido hidroxi butanodioico (CL, 88) (19.3)	ácido pentanodioico (CL, 86) (10.6)	ácido 2-hidroxi hexanodioico (CL, 89) (2.5)			
					
glicina (9.2)	sarcosina (6.3)	isoleucina (5.7)	prolina (3.5)	Valina (31.1)	
					
ácido 2-pirrol carboxílico (3.5)	2-carboxi piridina (CL, 93) (7.4)	3-carboxi piridina (CL, 88) (3.8)	4-carboxi piridina (CL, 89) (0.5)	ácido benzoico (4.5)	ácido 2-hidroxibenzoico (8.2)
		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	
fenol (0.3)	ácido (2-hidroxifenil) etanoico (CL, 81) (2.1)	ácido octadecanoico (esteárico) (1.2)	ácido tetradecanoico (palmítico) (20.8)	ácido dodecanoico (CL, 91) (0.4)	
Total identificado: $151.9 \mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra					

3.8 Estudio de espectrometría de masas de las fracciones

En las secciones anteriores hemos sometido a las fracciones a algunos tratamientos químicos de siliación o de hidrólisis severa seguida de siliación para el posterior análisis de la mezcla por CG-MS. Esto nos ha permitido identificar un gran número de compuestos diferentes. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente en el caso de hidrólisis básica, el tratamiento químico puede alterar la composición de la materia

orgánica y, además, la CG detecta exclusivamente compuestos volátiles. Las moléculas de alto peso molecular deben ser componentes minoritarios en el río Turia como se deduce de la necesidad de emplear membranas con un corte de tamaños de 90 Da, pero es evidente que el análisis por CG (incluso después de sililación) es más adecuado para componentes de bajo peso molecular.

Por estas razones, es de interés estudiar la composición materia orgánica por otras técnicas alternativas. En este contexto, hemos realizado un estudio completo de espectrometría de masas de las diferentes fracciones.

3.8.1 Análisis por MALDI-TOF-MS

Inicialmente se utilizó MALDI-TOF-MS. Esta técnica de espectrometría no tiene limitación en el peso molecular de los analitos³⁸. Los espectros de MALDI-TOF-MS de las diferentes fracciones se presentan en las Figuras 3.5-3.9. La característica más notable del análisis por MALDI-TOF-MS es la sencillez de los espectros correspondientes a las fracciones HPO-A y TPI-A. Además, también es importante destacar la masa molecular relativamente baja de los componentes. Debido a que MALDI-TOF-MS es una técnica de ionización suave que no fragmenta los analitos³⁸, los espectros de MALDI-TOF-MS mostrados en las Figuras 3.5-3.7 indican que el peso molecular de la mayoría de los componentes de la MOD está por debajo de 1.500 Da, observándose únicamente picos débiles con masas superiores a este valor. Teniendo en cuenta que la masa molecular de ácidos húmicos y fúlvicos, que son estructuras muy complejas, está por encima de los 2.000 Da³⁹, la primera conclusión empleando la técnica MALDI-TOF-MS es la ausencia de cantidades significativas de estos tipos de compuestos naturales.

Además, también observamos que existe un patrón en los espectros de las fracciones HPO-A y TPI-A, habiendo una serie de familias de picos separados a intervalos regulares en masa. Este patrón es especialmente evidente en el caso de la fracción TPI-A donde la familia de cinco picos en masa similar están separados por unos 270 Da. Principalmente se observan tres familias de picos en la región centrada en 550, 824 y 1092 Da. El patrón observado con MALDI-TOF-MS sugiere que los componentes del COD son principalmente familias de compuestos oligoméricos con masas moleculares relativamente bajas diferenciándose en el número de unidades monoméricas. La abundancia de los compuestos presentes en la MOD crece hacia masas moleculares bajas lo cual está de nuevo en concordancia con las observaciones anteriores de que la mayoría de los componentes de la MOD tienen sorprendentemente baja masa molecular.

Es importante destacar que, a pesar que la fracción HPO-A es similar a la fracción TPI-A, ésta exhibe un único pico prevalente a 825 Da acompañado por otros cuatro grupos

de señales menos intensas (comparar Figuras 3.5 y 3.6), siendo destacable además que los picos más abundantes son comunes en ambas fracciones. Además, de acuerdo con el estudio de CG-MS de los derivados sililados estas dos fracciones HPO-A y TPI-A también fueron muy similares. Esto sugiere que el procedimiento de fraccionamiento empleado siguiendo el protocolo convencional recomendado no es eficiente para separar los compuestos presentes en la MOD en fracciones diferentes. Este hecho ha sido recientemente demostrado por algunos autores trabajando con compuestos modelo hidrofóbicos y hidrofílicos ⁴⁰.

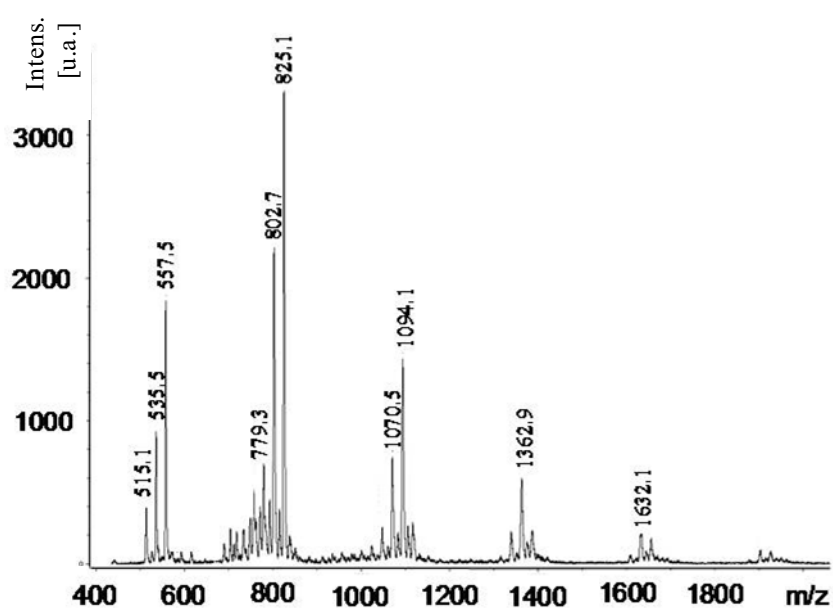


Figura 3.5. MALDI-TOF-MS de la fracción HPO-A.

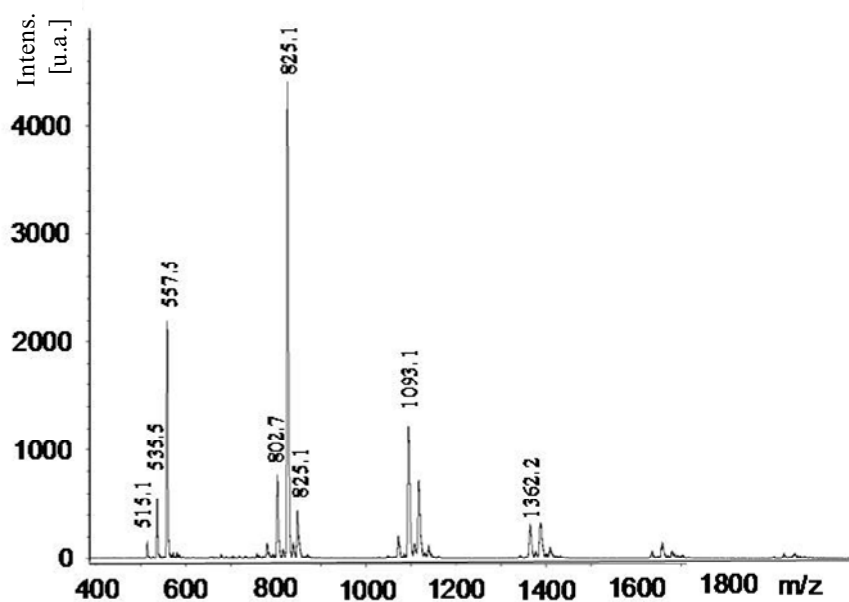


Figura 3.6. MALDI-TOF-MS de la fracción TPI-A.

Adicionalmente a estos espectros de MALDI-TOF-MS, las Figuras 3.7 y 3.8 presentan los resultados de dos experimentos independientes espaciados temporalmente una semana respecto al experimento mostrado en el texto principal. Dichos experimentos incluyen, tal y como se describe en la sección experimental, toma de muestra independiente seguida de concentración empleando la membrana NF90 y fraccionamiento con las resinas DAX8/XAD4. Dichas figuras muestran los espectros de las fracciones HPO-A y TPI-A registrados para estas dos muestras independientes. Estas dos fracciones son las dos más importantes en términos de COD (alrededor del 75% del COD). Tal y como se puede observar en esas Figuras los espectros obtenidos son muy similares a los mostrados en las Figuras 3.5 y 3.6, indicando que los principales compuestos constituyentes del río Turia se han mantenido prácticamente invariables durante el período estudiado (Junio-Julio del 2006).

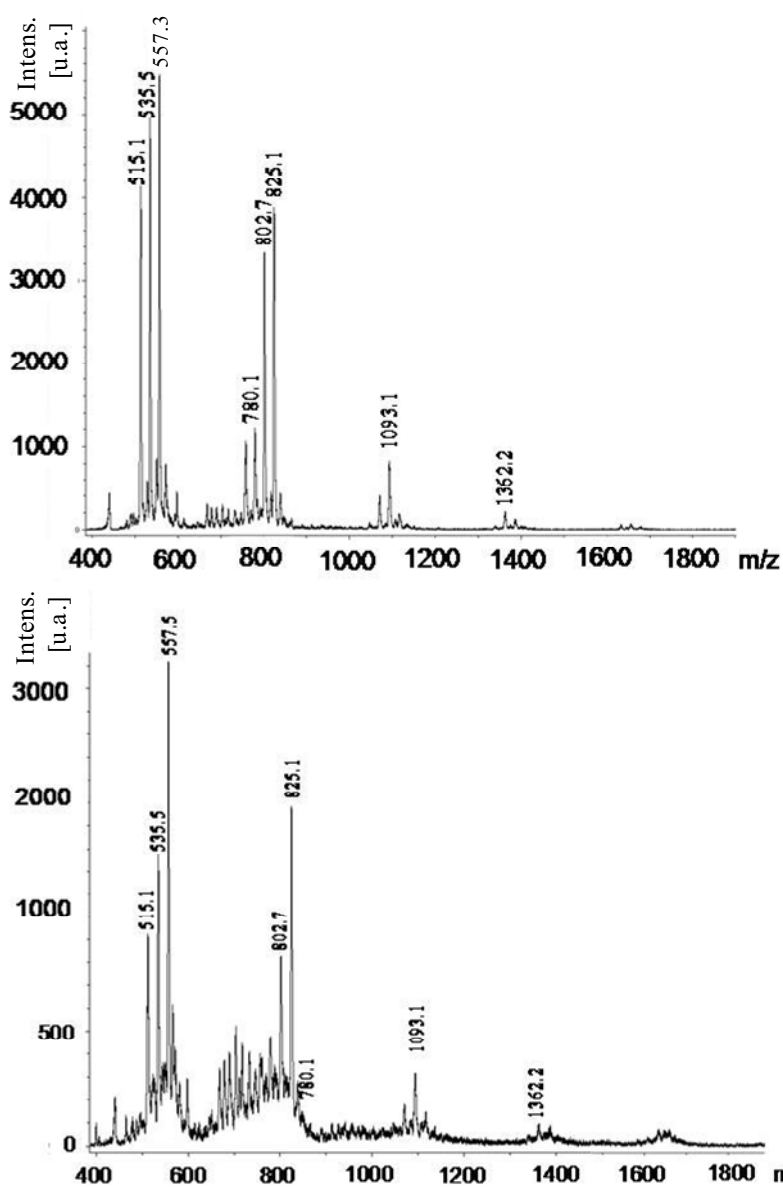


Figura 3.7. Espectros MALDI-TOF-MS de la fracción HPO-A en dos muestras de agua del río Turia diferentes y diferentes de la mostrada en la Figura 3.5.

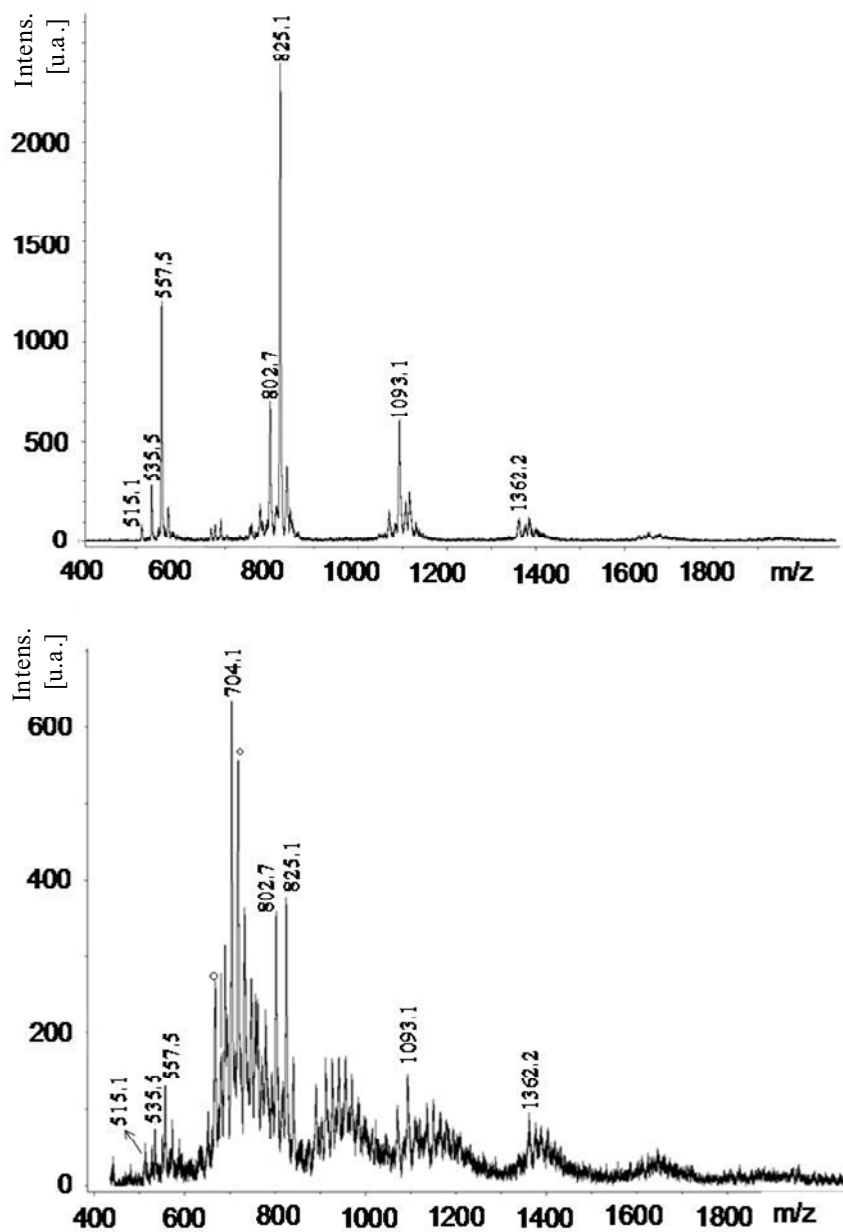


Figura 3.8. Espectros de MALDI-TOF-MS de la fracción TPI-A obtenida en dos muestras de agua del río Turia diferentes. Los puntos representan las señales de la matriz de ditranol.

Por otra parte la figura 3.9 muestra los espectros MALDI-TOF-MS de las fracciones HPO-N y HPI-A. Vuelve a confirmarse que las muestras están preferentemente constituidas por compuestos de pesos moleculares bajos y que la complejidad de las fracciones es relativamente baja. Sin embargo, la presencia de familias de picos visibles en los espectros MALDI-TOF-MS de las fracciones HPO-A y TPI-A es mucho menos aparente en estas dos fracciones.

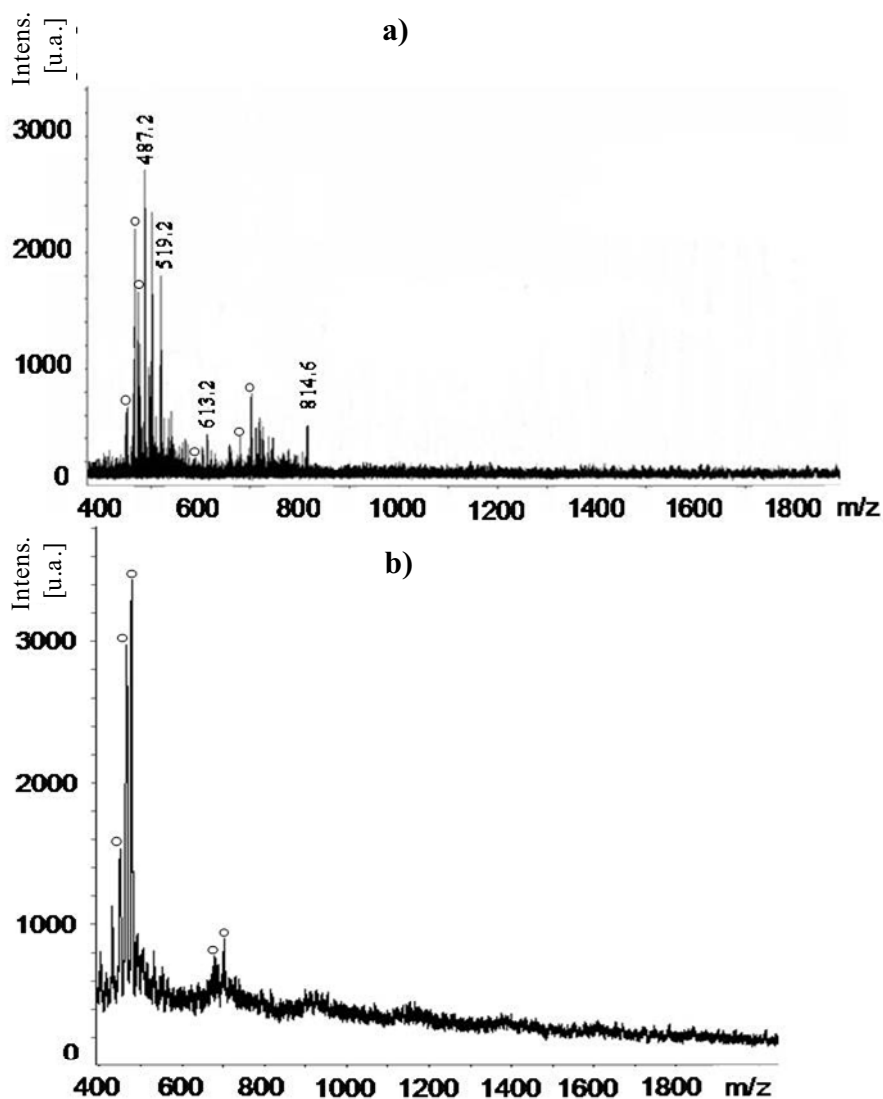


Figura 3.9. MALDI-TOF-MS de la fracción HPO-N (A) y de la fracción HPI-A (B).

Los puntos representan las señales de la matriz de ditranol.

Adicionalmente, la Figura 3.10 presenta el espectro de MALDI-TOF-MS del ditranol que es la matriz empleada en las medidas anteriores.

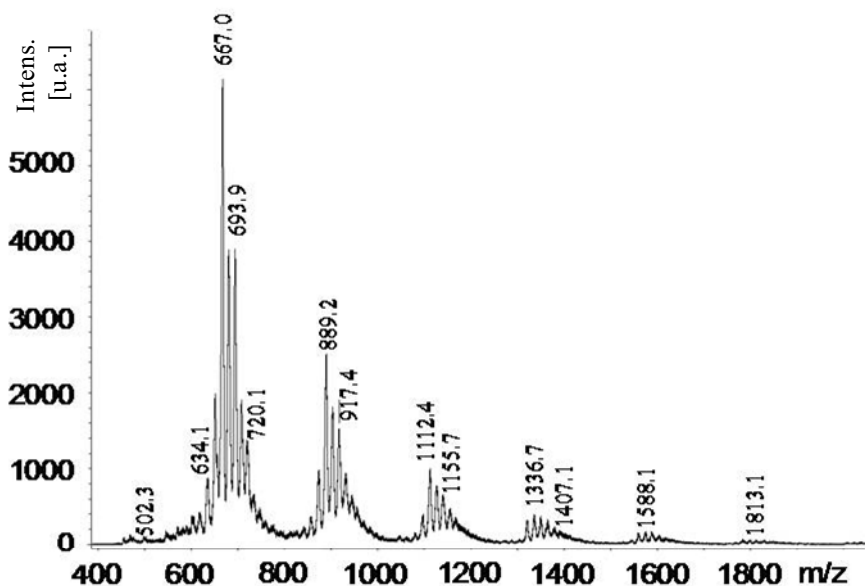


Figura 3.10. Espectro MALDI-TOF-MS de Ditranoil empleado como matriz en las medidas.

3.8.2 Análisis por ESI-API-MS y ESI-MS/MS

Con el fin de obtener información sobre la estructura y la composición de los picos más importantes, hemos sometido a las fracciones obtenidas tras el fraccionamiento a la técnica espectrométrica denominada ESI-API-MS. Esta técnica tiene tres diferencias principales^{41,42} con la MALDI-TOF-MS la cual es una técnica de ionización más suave: 1) la posible incorporación a la masa molecular del compuesto orgánico de iones presentes en la disolución o de los electrolitos empleados para favorecer la ionización; 2) la posibilidad de fragmentar la molécula en el proceso de ionización de la muestra; 3) la posibilidad formar compuestos doblemente cargados. La técnica ESI-API-MS tiene una limitación en el rango de masas que es capaz de detectar y que debe ser inferior a 1.700 Da. Sin embargo, a la vista de los comentarios anteriores sobre los pesos moleculares de los componentes presentes en el agua del río Turia parece que este rango de masas entre 150 y 1.700 Da es el adecuado para estudiar las muestras.

Puesto que analizamos directamente las cuatro fracciones (HPO-A, TPI-A, HPO-N y HPI-A), que no son compuestos puros, la presencia de fragmentación mediante esta técnica (ESI-API-MS) hace incierta la determinación de cuál es la complejidad de la mezcla

y la masa molecular de los constituyentes. Sin embargo la información acerca del número de componentes en la mezcla se ha obtenido mediante la técnica MALDI-TOF-MS tal y como se ha comentado anteriormente. La principal ventaja de la técnica ESI-API-MS empleando una trampa iónica es que ésta permite obtener el espectro de masas de los picos más relevantes mediante ESI-MS/MS. ESI-MS/MS proporciona una información única de crucial importancia debido a que seleccionando un único ión podemos determinar su espectro de masas.

Análisis por ESI-API-MS y ESI-MS/MS de las fracciones HPO-A y TPI-A

Las Figuras 3.11 y 3.12 muestran los espectros de ESI-API-MS de las fracciones HPO-A y TPI-A. Como puede verse en esas Figuras, el ESI-API-MS revela una notable regularidad en la diferencia de masas entre los picos, correspondiente a una diferencia de 81 ó 82 Da. Teniendo en cuenta la incertidumbre de la medición de las masas por esta técnica la discrepancia entre 81 y el 82 Da puede derivar del error de la medición o diferencias entre fragmentos que incluyen un protón además de la diferencia 81/82. En nuestro caso y basándonos en la literatura específica⁴³⁻⁴⁵ proponemos que las pérdidas de 81/82 observadas corresponden a pérdidas de unidades de hexosa deshidratada ($180-18=162$) entre fragmentos que poseen carga +2 formando parte de un glicósido ($M_1/2 - M_2/2=162/2=81$). Además, es notable que a partir de picos alrededor de 800 Da se observen una serie de fragmentos con una diferencia de masa de 81/82. Esta secuencia tiene lugar hasta masas inferiores a 81 Da (ver Figura 3.12) que debería corresponder a una subestructura unida al glicósido (aligón) o a una unidad de monosacárido ionizada. En ocasiones se observa algún aducto del Na^+ que presenta pérdidas de 23 Da. La formación de estos aductos deriva de la propia muestra o del propio equipo de medición (ver Figura 3.11).

Por consiguiente las diferencias de 81 Da entre picos del ESI-API-MS corresponderían a la pérdida de unidades de hexosa deshidratadas a partir de un ión con carga doble para dar lugar a otro ión de doble carga. Hay numerosos precedentes en la literatura química⁴³⁻⁴⁵ sobre la fragmentación de oligosacáridos que presentan el mismo patrón observado en las Figuras 3.11 y 3.12.

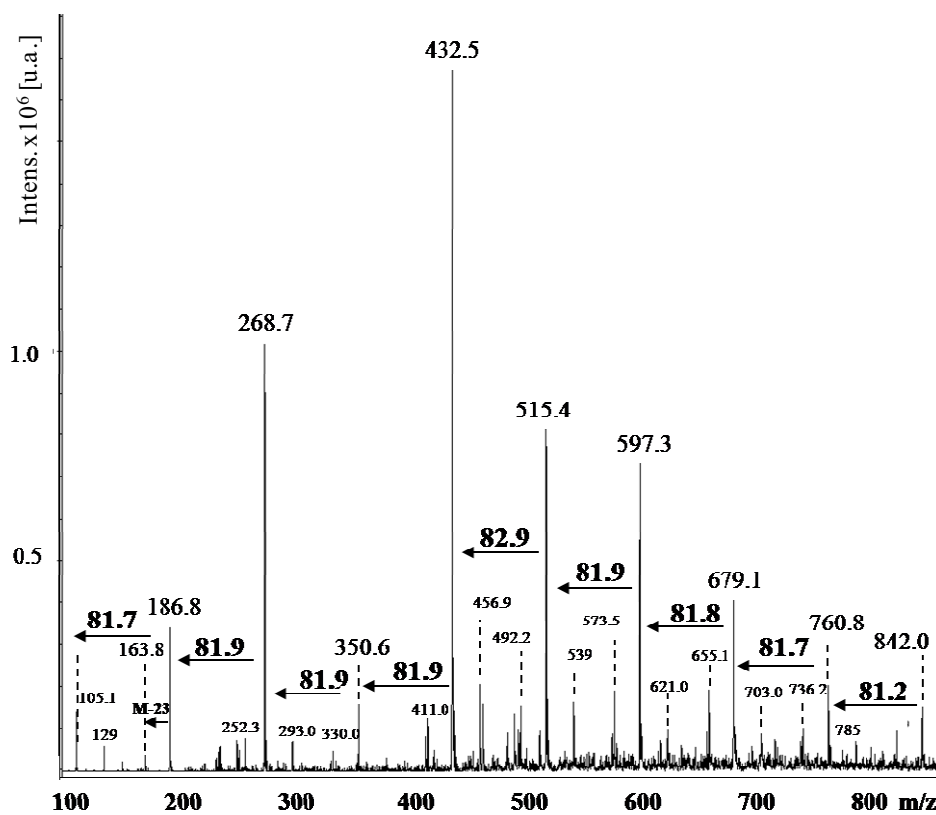


Figura 3.11. ESI-API-MS de la fracción HPO-A. Las pérdidas consecutivas de masas de 81/82 Da correspondientes a pérdidas de unidades de hexosas se han indicado en el espectro.

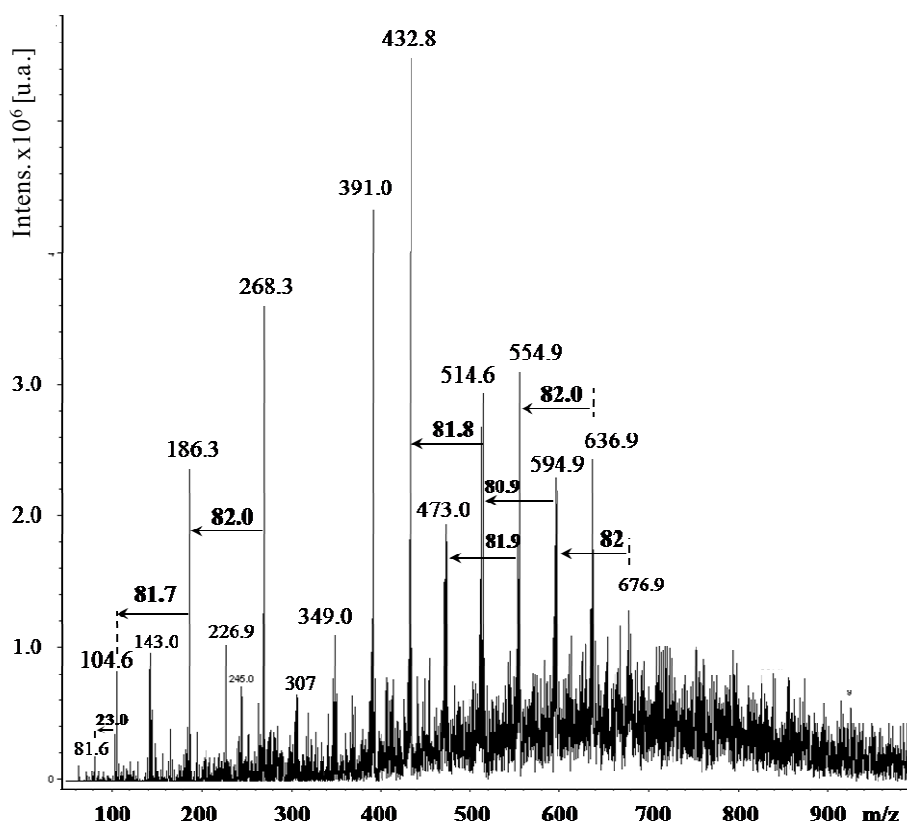


Figura 3.12. ESI-API-MS de la fracción TPI-A. Las pérdidas consecutivas de masas de 81/82 Da correspondientes a pérdidas de unidades de hexosas se han indicado en el espectro.

Para proporcionar evidencia adicional al hecho que las fracciones HPO-A y TPI-A están formadas por oligosacáridos, efectuamos un análisis MS/MS de ciertos picos que aparecen en el espectro ESI-API-MS. La Figura 3.13 muestra la fragmentación de los picos seleccionados más importantes registrados en MALDI-TOF-MS que sirven para ilustrar la composición de estas dos fracciones. Espectros adicionales de ESI-MS/MS de las fracciones HPO-A y TPI-A se muestran en la Figura 3.14. Los espectros de ESI-MS/MS permiten determinar el número de hexosas deshidratadas en el oligosacárido mediante el número de pérdidas de 81/82 Da. El pico final de masa menor del espectro podría corresponder a la unidad de aglicón a la cual las unidades de hexosa estaban enlazadas inicialmente. La Figura 3.13 muestra una posible estructura general deducida de los espectros de ESI-MS/MS en la cual AG indica la unidad de aglicón. En algunos casos la unidad de AG ha sido identificada (p. ej. Figura 3.13d y 3.14b con la N-

acetilhexosamina+Na⁺), basándonos en la bibliografía⁴³⁻⁴⁵, mientras que en otros casos la identidad de la unidad estructural AG es desconocida.

En definitiva, el estudio ESI-MS/MS confirma que los principales componentes de la MOD del río Turia son oligosacáridos. Basados en esto, proponemos que la regularidad observada en las Figuras 3.11 y 3.12 es debida a la presencia de familias de compuestos conteniendo el mismo número de unidades de hexosa pero diferenciándose en la unidad de aglicón.

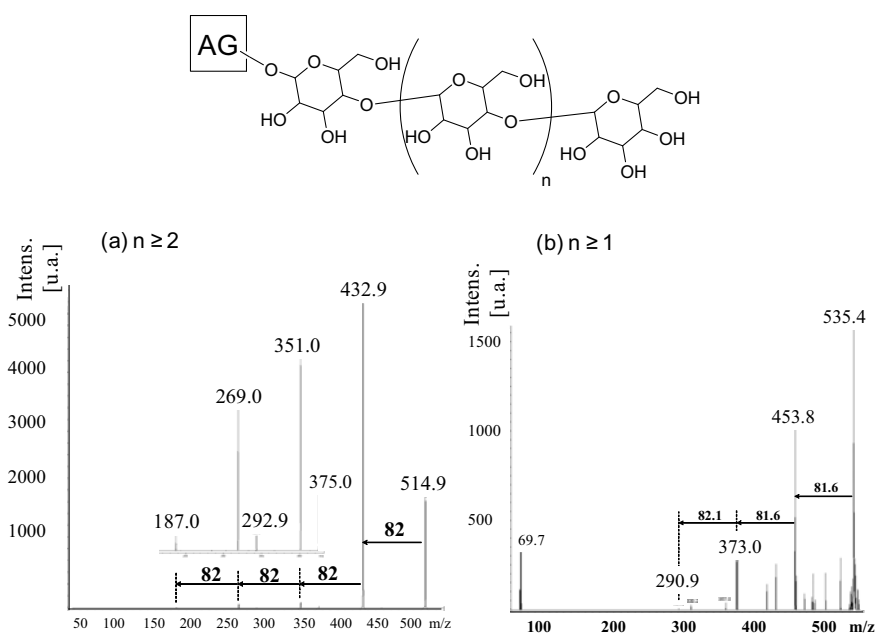


Figura 3.13. Espectros de masas obtenidos por tándem ESI-MS/MS de algunos picos comunes y representativos de las fracciones HPO-A y TPI-A. Picos seleccionados: (a) 515 Da; (b) 535 Da.

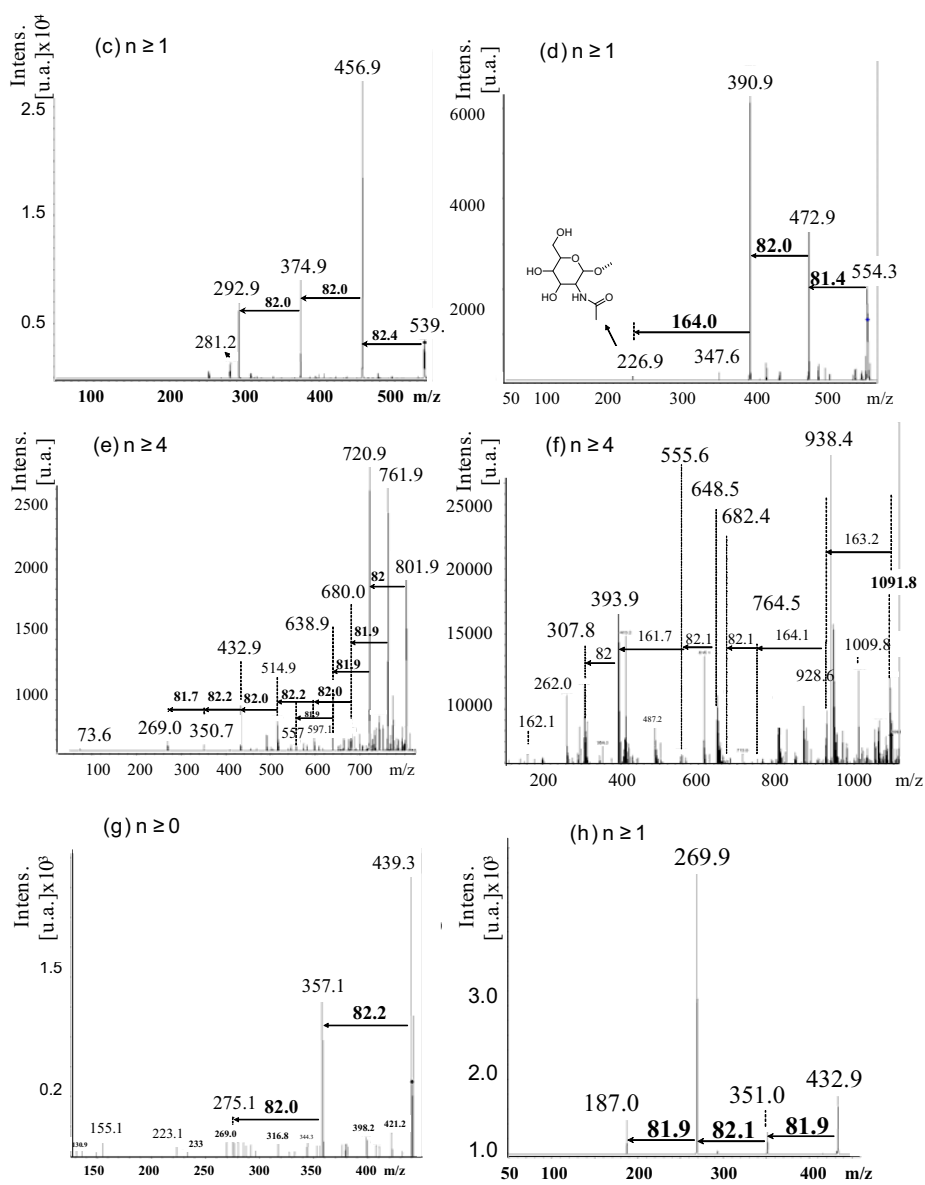


Figura 3.13. Espectros de masas obtenidos por tándem ESI-MS/MS de algunos picos comunes y representativos de las fracciones HPO-A y TPI-A. Picos seleccionados: (c) 539 Da; (d) 554 Da; (e) 802 Da; (f) 1092 Da; (g) 439 Da; (h) 433 Da.

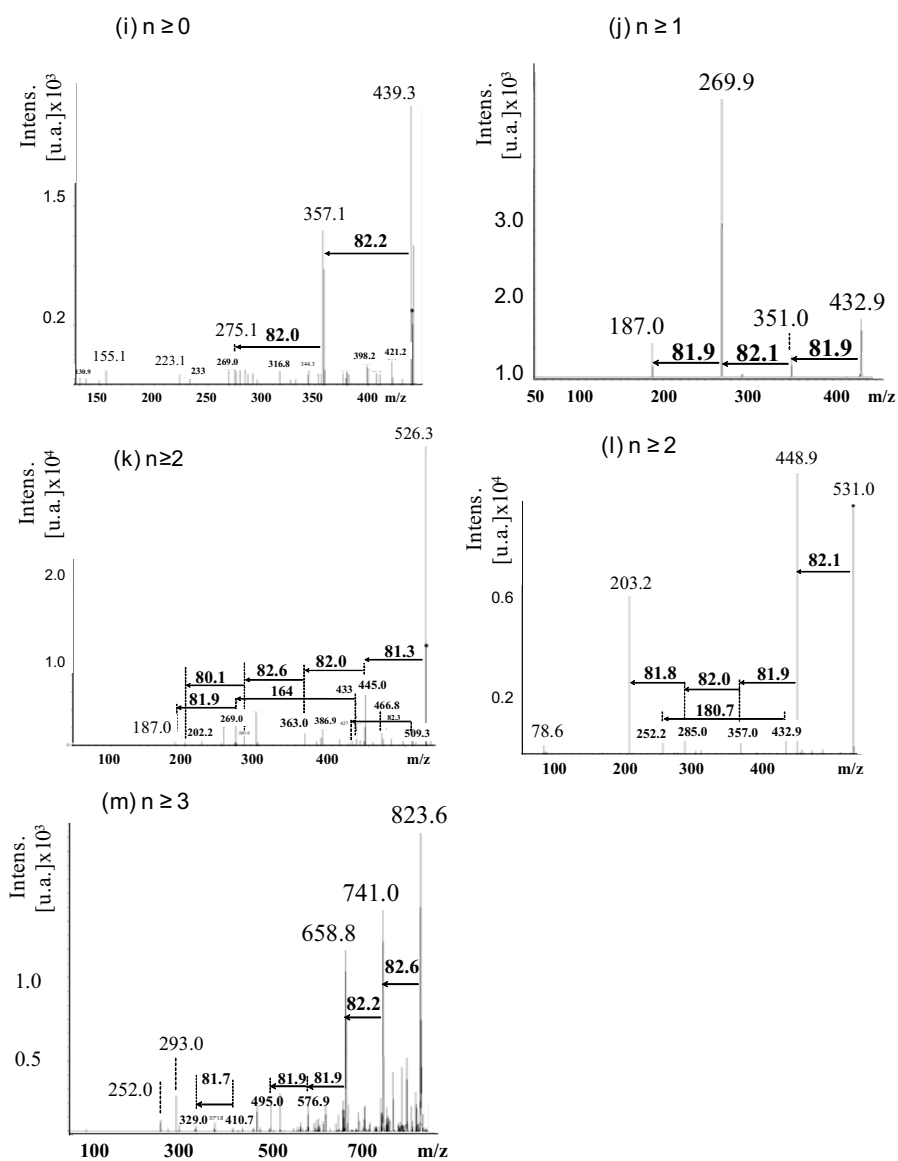


Figura 3.13. Espectros de masas obtenidos por tándem ESI-MS/MS de algunos picos comunes y representativos de las fracciones HPO-A y TPI-A. Picos seleccionados: (i) 439 Da; (j) 433 Da; (k) 526 Da; (l) 531 Da; (m) 823 Da.

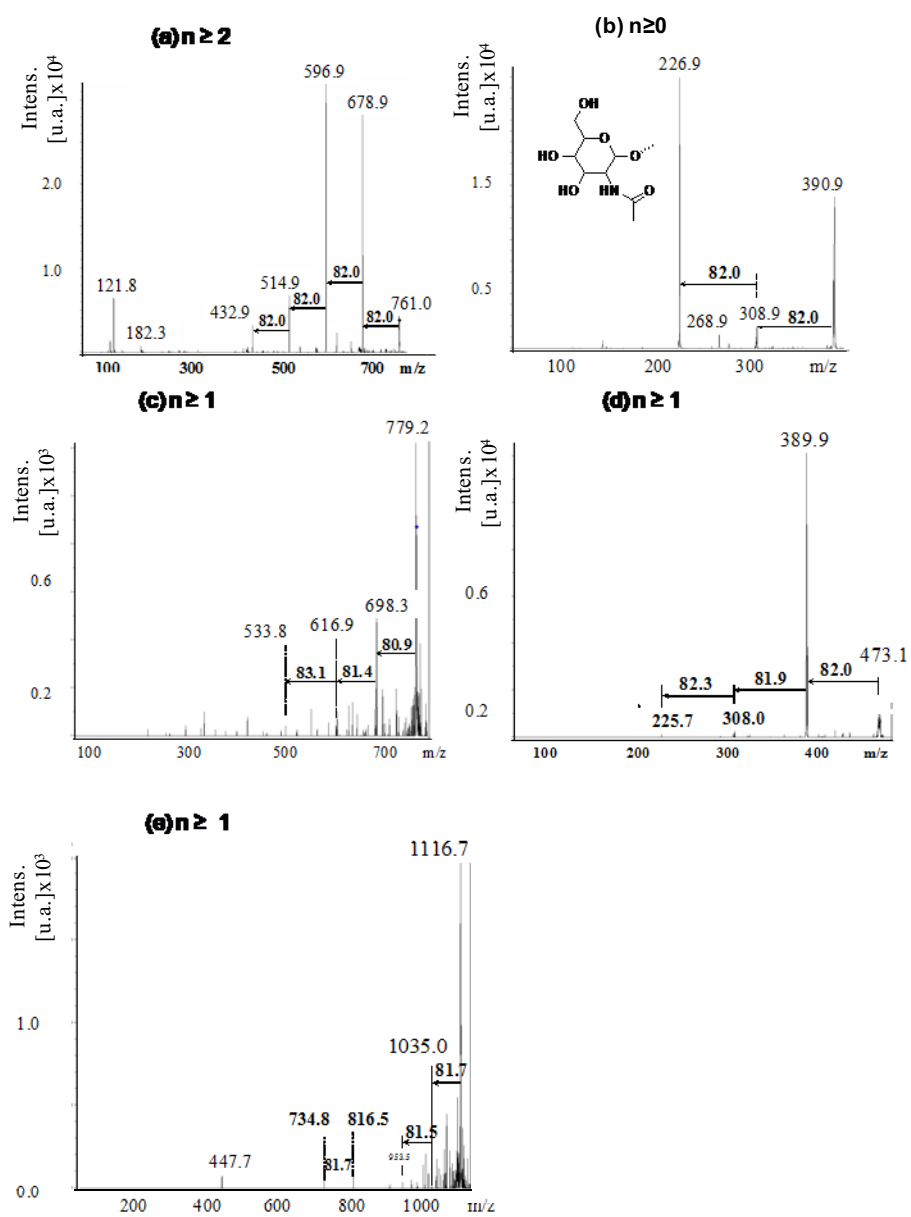
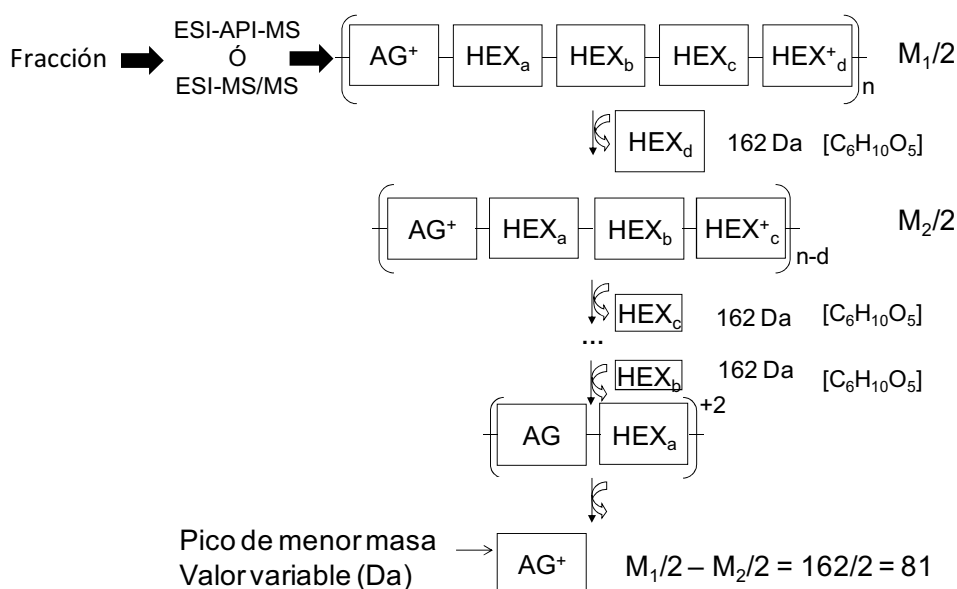


Figura 3.14. Espectro de masas obtenidos mediante tandem ESI-MS/MS de algunos picos correspondientes a la fracción HPO-A: (a) 761 Da; y TPI-A: (b) 391, (c) 473, (d) 779 y (e) 1116 Da

El Esquema 3.3 ilustra la propuesta para racionalizar el comportamiento en el espectro ESI-API-MS. Dicha propuesta asume que los iones llevarán una carga +2 como se ha observado en numerosos precedentes^{42,43,45}. Así pues, la pérdida consecutiva de 81/82 Da representaría la fragmentación gradual de unidades de hexosa enlazadas a un aglicón formando parte de un oligoglicósido. En este oligoglicósido la carga total es +2. Normalmente una de estas dos cargas reside en el aglicón y la otra en la parte del carbohidrato que va sufriendo la fragmentación. La carga en el carbohidrato se genera generalmente en el proceso de ionización, mientras que la carga del aglicón suele estar presente antes de la medida con ESI-API-MS. Conviene recordar el empleo de agua ácida al trabajar con ESI-MS/MS para promover la presencia de cargas positivas por protonación.



Esquema 3.3. Propuesta para racionalizar la fragmentación observada en el espectro ESI-MS/MS. Los acrónimos AG y HEX corresponden a aglicón y hexosa, respectivamente.

En resumen, el estudio de ESI-MS/MS confirma que los principales componentes de la MOD del río Turia son oligosacáridos. Basados en esto, proponemos que la regularidad observada en las Figuras 3.5-3.8 (MALDI-TOF-MS) se debe a la presencia de familias de compuestos del mismo número de unidades de hexosas difiriendo en la unidad de aglicón.

En general, la información obtenida a partir de la técnica de tándem ESI-MS/MS demuestra la presencia de hexosas como unidades constituyentes de los componentes de las fracciones HPO-A y TPI-A. Estos datos son compatibles con la caracterización espectroscópica de las fracciones, especialmente con el espectro de RMN-¹H que muestra bandas entre 3-5 ppm y el espectro de RMN-¹³C con la presencia de carbonos alrededor de 70 ppm, característicos de los sacáridos. También, el análisis por CG-MS de los derivados sililados ha mostrado un gran número de monosacáridos (véanse las Tablas 3.6-3.9). El hecho que no se observen oligosacáridos por CG-MS no es sorprendente considerando que su alto peso molecular, la baja volatilidad, o la incompleta sililación podría hacer que estos compuestos no se puedan analizar adecuadamente por CG-MS. Además, las fuertes condiciones ácidas requeridas para llevar a cabo la sililación podrían causar la hidrólisis parcial de oligosacáridos a monosacáridos. Con el fin de aportar datos experimentales que apoyen esta hipótesis, se sometió a derivatización la maltotriosa (un trisacárido que tiene tres unidades de glucosa y una masa molecular de 504 Da), realizando a continuación un análisis por CG-MS de la mezcla resultante de sililación de la maltotriosa pura. En este ensayo control se detectó exclusivamente alrededor de un 1% de monosacáridos isoméricos, probablemente derivados de la hidrólisis ácida de la maltotriosa en las condiciones de derivatización. Así pues, para una masa de maltotriosa de 10 mg sólo el 1% se detectó como glucosa. Se puede asumir que resultados análogos se obtendrían para otros oligosacáridos. De esta manera, las hexosas identificadas en el análisis por CG podrían estar en el agua formando los oligosacáridos observados en MALDI-TOF-MS y ESI-MS/MS.

Las técnicas de MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS y los estudios de sililación indican que el agua del río Turia tiene como principales componentes oligosacáridos de peso molecular por debajo de 1.700 Da. Con esta masa molecular el número máximo de unidades de hexosa en los oligosacáridos es seis (Figura 3.13f). Esta característica general de la MOD del río Turia está de acuerdo con la regularidad observada en MALDI-TOF-MS donde cada grupo de picos correspondería a oligosacáridos con el mismo número de unidades de azúcar y una subestructura de aglicón terminal diferente. Así pues, el análisis de CG-MS de los derivados de trimetilsililo volátiles está sesgado por la detección de los componentes más pequeños (hexosas) que podrían formar parte de oligosacáridos. Merece

destacarse la ausencia de ácidos húmicos y fúlvicos que son compuestos naturales cuya presencia es ampliamente aceptada como universal en agua dulces. La presencia de ácidos húmicos y fúlvicos se descarta porque en caso que estos compuestos estuviesen presentes se habrían observado en MALDI-TOF-MS picos de elevado peso molecular (> 2.000 Da) sin fragmentaciones consecutivas de hexosas en el análisis mediante ESI-API-MS y ESI-MS/MS.

Con el fin de proporcionar más apoyo a nuestras conclusiones se llevó a cabo los espectros de ESI-MS/MS de la maltotriosa y la maltosa (dos oligosacáridos con tres y dos unidades de glucosa, respectivamente) así como a una muestra comercial de ácidos húmicos suministrados por Aldrich. La Figura 3.15 muestra los espectros obtenidos para la maltotriosa y la maltosa. Como puede verse la fragmentación de la maltotriosa y de la maltosa está caracterizada por la pérdida de unidades de 162 Da, hecho que está de acuerdo con los datos descritos en la literatura ⁴⁶. La Figura 3.16 muestra el ESI-MS/MS de algunos picos representativos del ESI-API-MS de los ácidos húmicos. Esta Figura establece la ausencia de un patrón en la fragmentación con pérdidas consecutivas de 81/82 Da y la gran complejidad del espectro de masas de los ácidos húmicos. En los ácidos húmicos la relativa elevada intensidad de sus iones moleculares indica la alta estabilidad de estas moléculas, típica de las estructuras aromáticas que poseen este tipo de ácidos. Así pues, la fragmentación completamente diferente del patrón de los oligosacáridos y de los ácidos húmicos refuerza nuestra conclusión sobre la naturaleza de la MOD del río Turia.

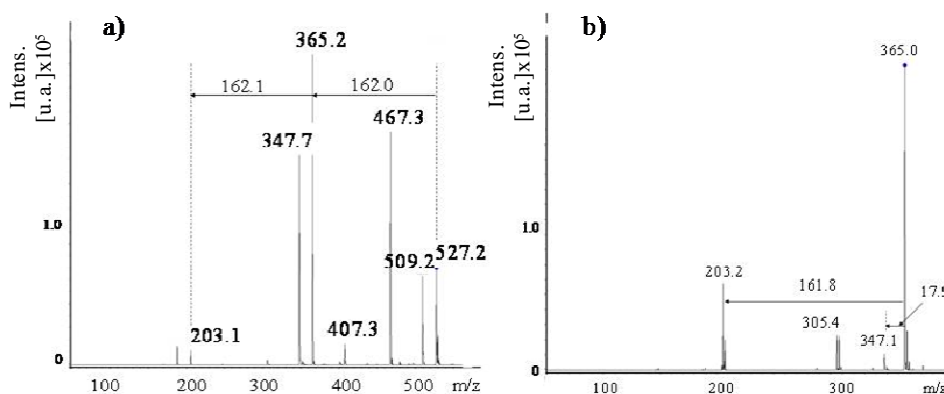


Figura 3.15. Espectros de ESI-MS/MS de muestras comerciales de maltotriosa (a) y maltosa (b).

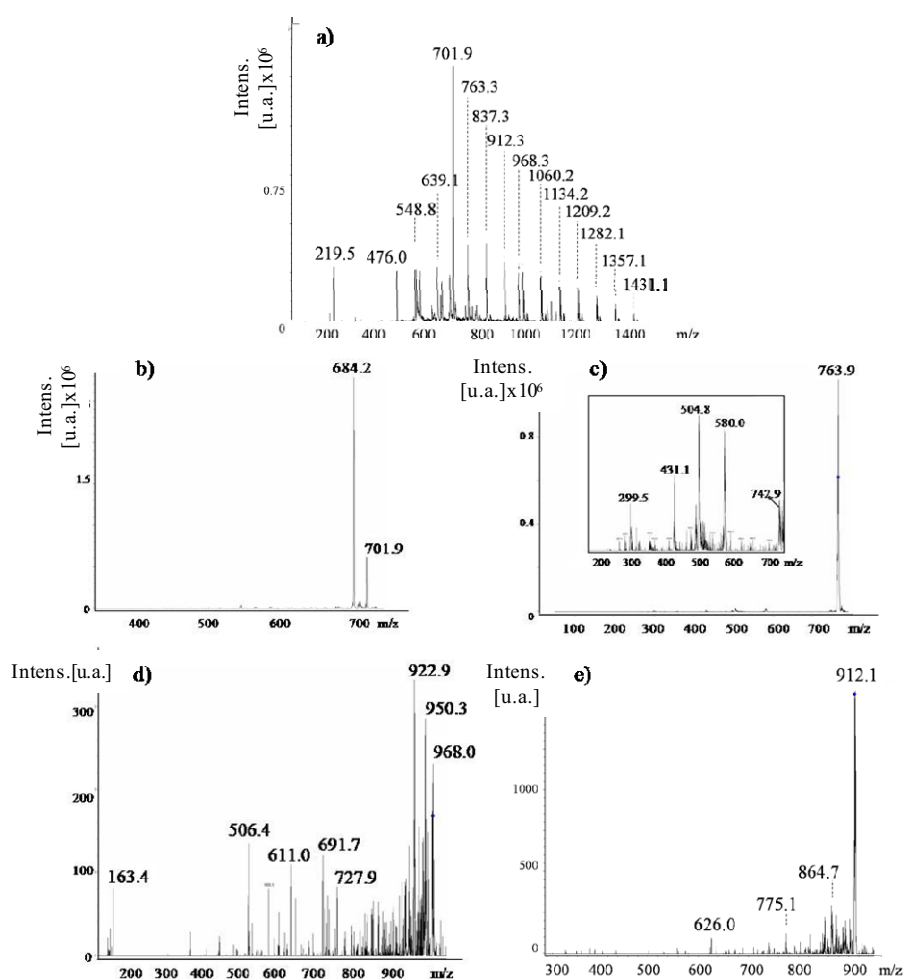


Figura 3.16. Espectros ESI-MS (a) y ESI-MS/MS (b, c, d, e) de picos seleccionados de una muestra comercial (Aldrich) de ácidos húmicos.

Análisis por ESI-API-MS y ESI-MS/MS de las fracciones HPO-N y HPI-A

Después de haber comentado los datos de MALDI-TOF-MS, ESI-API-MS y ESI-MS/MS de las fracciones HPO-A y TPI-A, se llevó a cabo un estudio similar con las fracciones HPO-N y HPI-A. La Figura 3.9, muestra los espectros MALDI-TOF-MS de las fracciones HPO-N y HPI-A. En estos casos parece que estas dos fracciones son más complicadas que las anteriores y no se observa patrón claro en los espectros de masas de las mezclas. Concretamente la muestra HPI-A parece estar constituida por componentes de bajo peso molecular (<400 Da) puesto que prácticamente en el espectro únicamente se ve la matriz empleada para el análisis (ditranol). Esta complejidad se ve más claramente en los espectros de ESI-API-MS de las muestras correspondientes (Figura 3.17). En la Figura 3.18 se recogen algunos espectros de ESI-MS/MS correspondientes a las muestras HPO-N y HPI-A donde la complejidad de los mismos no ha permitido la elucidación estructural.

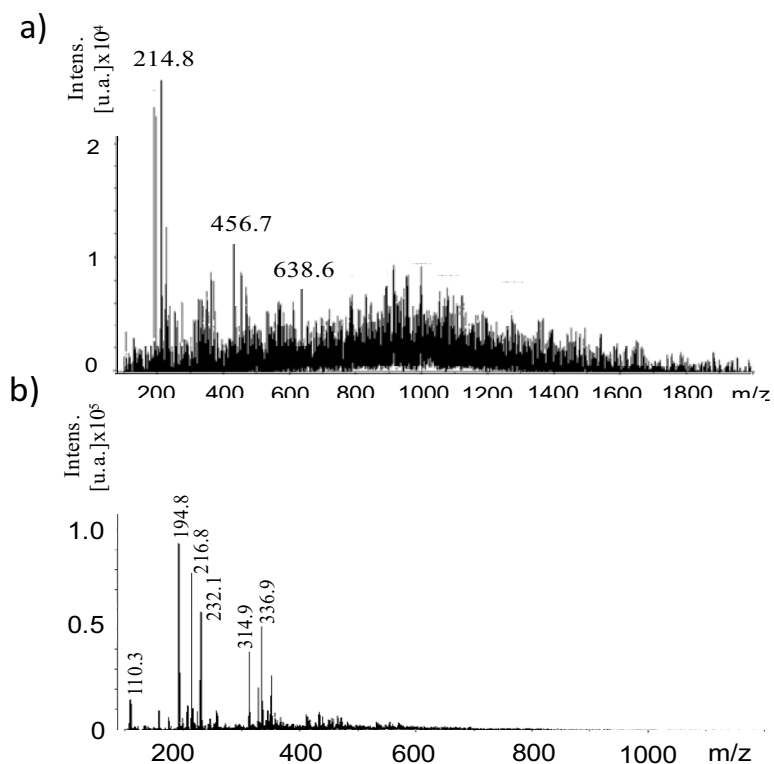


Figura 3.17. ESI-API-MS de las fracciones HPO-N (a) y HPI-A (b).

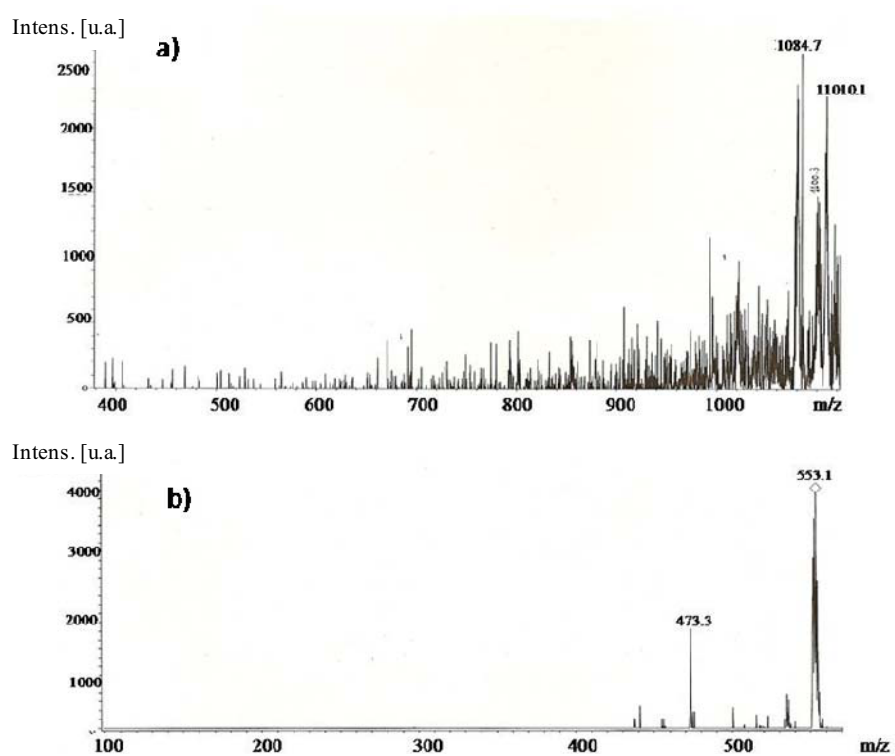
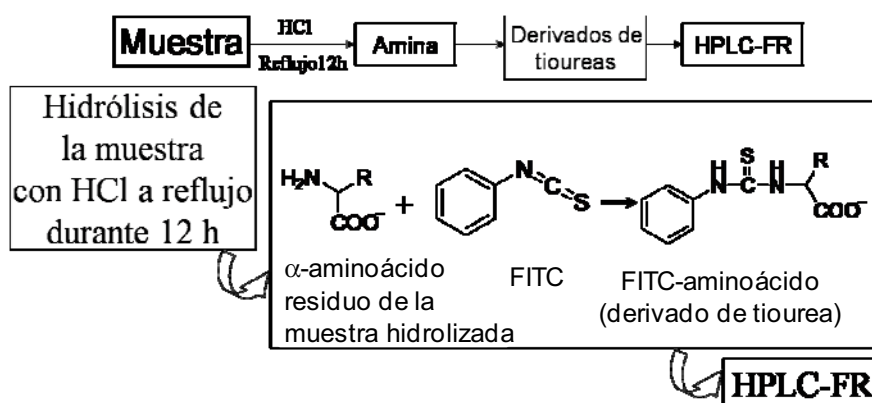


Figura 3.18. Espectros ESI-MS/MS de dos picos representativos de las fracciones HPO-N (a) y HPI-A (b) aisladas del río Turia.

3.9 Análisis de aminoácidos

Es común que las aguas naturales tengan presente una cantidad variable de péptidos y aminoácidos. A fin de establecer si el agua del río Turia contiene cantidades detectables de oligopéptidos se sometieron las cuatro fracciones aisladas a una hidrólisis ácida y la mezcla resultante tras hidrólisis fue tratada con fenilisotiocianato (FITC) a fin de formar derivados de aminoácidos que puedan ser analizados mediante HPLC de fase reversa (FR) y detección UV (ver Esquema 3.4).



Esquema 3.4. Protocolo seguido para el análisis de aminoácidos por derivatización con FITC y análisis por HPLC-FR empleando detección UV.

Este es el procedimiento recomendado que es ampliamente utilizado en Bioquímica para determinar la composición de aminoácidos de los péptidos ⁴⁷. Las N-fenil tioureas resultantes de la derivatización con FITC fueron caracterizadas y cuantificadas por HPLC-FR comparando los tiempos de retención con muestras auténticas. Siguiendo este protocolo, hemos sido capaces de identificar y cuantificar los aminoácidos mostrados en la Tabla 3.14.

Tal y como se observa en la Tabla 3.15 la fracción HPO-N con $177.62 \mu\text{g mg}^{-1}$ es la que contiene la mayor concentración de aminoácidos. Estos datos están de acuerdo con la caracterización espectroscópica anterior donde se observó una banda a 1628 cm^{-1} en el espectro de IR-FT. Además, la fracción HPO-N presentaba en RMN-¹H las señales características de los aminoácidos: 1) entre 3.9 y 3.3 ppm para los H en posición α ; 2) entre 3.3 y 2.0 ppm los H de la cadena alifática. Por otra parte en espectro de RMN-¹³C se registraron señales: 1) entre 50-30 ppm correspondiente al C en posición α ; 2) 74 y 20 ppm los C alifáticos. Además tras hidrolizar la muestra HPO-N en medio básico se detectaron en CG-MS varios derivados sililo de aminoácidos. Especialmente relevante es la presencia del

ácido aspártico el cual es de entre todos los aminoácidos uno de los precursores que originan mayores concentraciones de ácidos haloacéticos (HAAs) origina⁴⁸.

Tabla 3.14. Aminoácidos detectados después de hidrólisis ácida de las diferentes fracciones ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra)

	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
Ácido aspártico	0.07		98.37	
Ácido glutámico	0.48	0.2	4.10	0.21
Serina			1.08	
Glicina	0.35		6.03	0.18
Histidina	0.16			0.06
Arginina				
Treonina				
Alanina			3.35	0.24
Prolina			58.47	
Valina	0.19	0.06		
Metionina				
Cisteina				
Isoleucina				
Leucina	0.06	0.03		
Fenilalanina			6.22	
Lisina				
Total ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra)	1.31	0.29	177.62	0.69

3.10 Conclusiones

Nuestro estudio es relevante para ilustrar las grandes diferencias en la composición del agua del río Turia con respecto a la composición ampliamente aceptada como general de los recursos hídricos de la materia orgánica descrita en los estudios de caracterización de aguas de diferente origen.

El conocimiento de la composición química puede servir para aumentar el entendimiento sobre los precursores de THMs y a largo plazo podría constituir la base para mejorar calidad del agua potable basándose en estrategias específicamente diseñadas para un recurso natural.

Así los datos que se han presentado ponen de manifiesto que la materia orgánica disuelta del río Turia está formada básicamente por grupos de familias de compuestos con pesos moleculares por debajo de 2.000 Da. Además se ha demostrado la ausencia de ácidos húmicos y fúlvicos que generalmente se consideran estar presentes en todos los tipos de aguas superficiales.

3.11 Referencias bibliográficas

- [1] European Union, Council directive 98 / 83 / EC of 3 november 1998 relating to the quality of water intended for human consumption, Off. J. Eur. Communities L 330 (1998) 32-54..
- [2] USEPA, National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products, final rule; Washington, DC.69390-69476, 1998.
- [3] BA Bergamaschi, MS Fram, R Fujii, GR Aiken, C Kendall, SR Silva: Trihalomethanes formed from natural organic matter isolates: using isotopic and compositional data to help understand sources. ACS Symposium Series 761 (2000) 206-22.
- [4] USEPA, SAB report: safe drinking water. Future trends and challenges. An environmental futures report. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. FIELD URL.: 1995, p. 25 pp.
- [5] USEPA: National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products, final rule; Washington, DC. (1998) 69390-476.
- [6] EU: Directive on the quality of water intended for human consumption. 98/83/CE. (1998).
- [7] DM Owen, GL Amy, ZK Chowdury, R Paode, G McCoy, K Viscosil: NOM characterisation and treatability. J. Am. Water Works Assoc. 87 (1995) 46-63.
- [8] O Kammona, E Dini, C Kiparissides, R Allabashi: Synthesis of polymeric microparticles for water purification. Microporous and mesoporous materials 110 (2008) 141-49.
- [9] TA Bellar, JJ Lichtenberg, RC Kroner: Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. Journal - American Water Works Association 66 (1974) 703-6.
- [10] B Legube, JP Croue, M Dore: Chlorination of humic substances in aqueous solution: yields of volatile and major non-volatile organic halides. Science of the Total Environment 47 (1985) 217-22.
- [11] DA Reckhow, PC Singer, RL Malcolm: Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations. Environmental Science and Technology 24 (1990) 1655-64.
- [12] JJ Rook: Formation of haloforms during chlorination of natural waters. Water Treatment and Examination 23, Pt. 2 (1974) 234-43.
- [13] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (BOE 45/2003, de 21 feb).
- [14] EM Perdue, ET Gjessing: Introduction. In organic acids in aquatic ecosystems, eds E. M. Perdue and E. T. Gjessing, pp. 1-3. Wiley, Chichester. (1990).
- [15] EM Thurman: Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Pub, Dordrecht. (1985).
- [16] JP Croue, B Martin, P Simon, B Legube: Hydrophobic and hydrophilic substances in reservoir waters - extraction, characterization, and determination. Water Supply 11 (1993) 79-90.
- [17] FJ Stevenson: Humus chemistry genesis, composition, reactions. Wiley Interscience, New York. (1982).
- [18] J Buffle, Greter F.L., H W.: Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. Anal. Chem. 49 (1977) 216-22.
- [19] J Buffle, P Deladoey, W Haerdi: The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. Analytica Chimica Acta 101 (1978) 339-57.
- [20] ET Gjessing: Ultrafiltration of aquatic humus. Environmental Science and Technology 4 (1970) 437-8.
- [21] ET Gjessing, JJ Alberts, A Bruchet, PK Egeberg, E Lydersen, LB McGown, JJ Mobed, U Munster, J Pempkowiak, M Perdue, H Ratnawerra, D Rybacki, M Takacs, G Abbt-Braun: Multi-method characterization of natural organic matter isolated from water: characterization of reverse osmosis-isolates from water of two semi-identical dystrophic lakes basins in Norway. Water Research 32 (1998) 3108-24.
- [22] H Oedegaard, S Koottatep: Removal of humic substances from natural waters by reverse osmosis. Water Research 16 (1982) 613-20.
- [23] SM Serkiz, EM Perdue: Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee River using reverse osmosis. Water Research 24 (1990) 911-16.
- [24] B Bolto, D Dixon, R Eldridge, S King, K Linge: Removal of natural organic matter by ion exchange. Water Research 36 (2002) 5057-65.
- [25] W Koelle, Humic acid removal with macroporous ion exchange resins at Hannover. Stadtwerke Hannover A.-G., Hannover, Fed. Rep. Ger. FIELD URL.: 1984, p. 805-11.
- [26] GR Aiken, EM Thurman, RL Malcolm, HF Walton: Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. Analytical Chemistry 51 (1979) 1799-803.
- [27] JA Leenheer: Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. Environmental Science and Technology 15 (1981) 578-87.
- [28] EM Thurman, RL Malcolm: Preparative isolation of aquatic humic substances. Environmental Science and Technology 15 (1981) 463-6.
- [29] JAE Buffle: Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux. Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquée de A.G.H.T.M.. l'Université d'Orsay, 3-10. (1977).
- [30] RF Christman: Progress Reports, EPA Research Grant No. R804430. (1979).
- [31] SI Dragunov: Soil Organic Matter, M.M. Kononova, Ed. (New York: Pergamon Press) p.65. (1961).
- [32] JA Leenheer, DM McKnight, EM Thurman, P. MacCarthy: Structural components and proposed structural models of fulvic acid from the Suwannee River. In R.C. Averett, J.A. Leenheer, D.M. McKnight, and K.A. Thorn, eds. Humic substances in the Suwannee river, Georgia: interactions, properties, and proposed structures. USBS Report 87-557, Denver, CO. (1989) 335-59.
- [33] JA Leenheer, MA Wilson, RL Malcom: Presence and potential significance of aromatic-ketone groups in aquatic humic substances. Org. Geochemistry 11 (1987) 273-80.
- [34] JJ Rook: Haloforms in drinking water. J. Am. Water Works Assoc. 68 (1976) 168-72.

- [35] JJ Rook: Chlorination of fulvic acids in natural waters. *Environmental Science and Technology* 11 (1977) 478-82.
- [36] M Schnitzer, SU Khan: Humic substances in the environment (New York: Marcel Dekker) p. 147. (1972).
- [37] MA Huizhong, EA Herbert, Y Y.: Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research* 35 (2001) 985-96.
- [38] F. Hillenkamp, J.P. Katalinic. MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications. Hardcover, 2007.
- [39] Y-P. Chin, G. Aiken, E.O. Loughlin, Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 1853-1858.
- [40] T. Bond, O. Henriot, E.H. Goslan, S.A. Parsons, B. Jefferson, Disinfection byproduct formation and fractionation behavior of natural organic matter surrogates, *Environ. Sci. Technol* (DOI: 10.1021/es900686).
- [41] S.M. Mugo, C.S. Bottaro, Characterization of humic substances by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2375-2382
- [42] MJ Huddleston, M.F. Bean, and S.A. Carr.: Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Analytical Chemistry* 65 (1993) 877-84.
- [43] BD Woosley, YH Kim, VS Kumar Kolli, L Wells, D King, R Poe, R Orlandoa, C Bergmanna: Glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase A. *Carbohydrate Research* 341 (2006) 2370-78.
- [44] SK Bao-Shiang Lee, Syed Salman Lateef, Nabila Salman Lateef and Shalini Gupta: Oligosaccharide analyses of glycopeptides of horseradish peroxidase by thermal-assisted partial acid hydrolysis and mass spectrometry. *Carbohydrate Research* 340 (2005) 1859-65.
- [45] S Zhang, D. Chelius. Characterization of protein glycosylation using chip-based infusion nano-electrospray linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques* 15 (2004).
- [46] A. Cappiello, H. Trufelli, G. Famigliani, E. Pierini, S. Capellacci, A. Penna, F. Ricci, C. Ingarao, N. Penna, Study on the oligosaccharides composition of the watersoluble fraction of marinemucilage by electrospray tandem mass spectrometry, *Water Res.* 41 (2007) 2911 – 2920.
- [47] W.J. Dress, S.J. Newell, A.J. Nastase, J.C. Ford, Analysis of amino acids in nectar from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae), *American Journal of Botany* 84 (1997) 1701-06
- [48] HC Hong, MH Wong, L Y.: Amino acids as precursors of trihalomethane and haloacetic acid formation during chlorination. *Arch Environ Contam Toxicol* 56 (2009) 638-45.

Capítulo 4

Carbohidratos como precursores de trihalometanos. Influencia del pH y de la concentración de Br^- y Cl^- en el potencial de formación de trihalometanos.

4.1 Introducción

Entre la materia orgánica de origen natural que se encuentra disuelta en agua dulce de ríos y lagos destacan los ácidos húmicos ¹. Los ácidos húmicos son macromoléculas orgánicas de origen natural y estructura variable en donde algunas partes de la misma contienen subestructuras de resorcinol, carbohidratos y dicetonas (ver Figura 4.1) ². Así pues, un ácido húmico puede considerarse estar constituido por la unión de componentes más simples incluyendo a los carbohidratos.

Desde los estudios pioneros de Rook y Boyce ³⁻⁶ mostrando la formación de subproductos de desinfección por reacción del cloro con la materia orgánica en disolución y considerando que los ácidos húmicos contienen en su estructura subunidades fenólicas, la mayoría de estudios en la formación de THMs se han centrado en la cloración de compuestos fenólicos y la determinación del mecanismo de formación de THMs a partir de ellos ⁷⁻⁹.

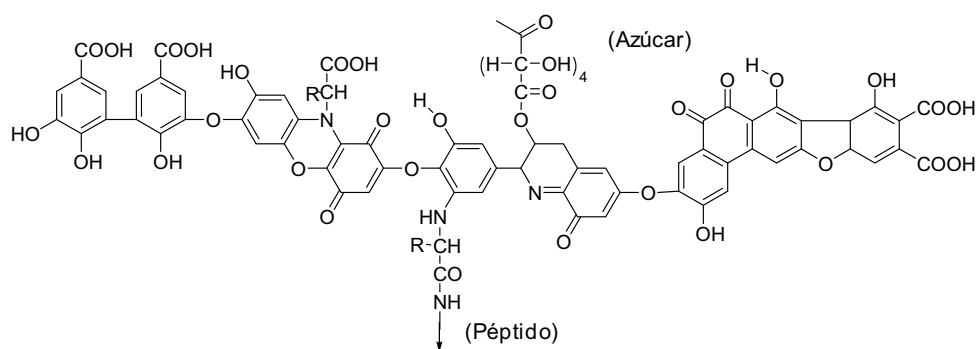


Figura 4.1. Estructura general de sustancias húmicas según Stevenson ²

Además de los ácidos húmicos, otras biomoléculas de origen natural también están presentes en los recursos acuáticos y pueden potencialmente dar lugar a la formación de THMs cuando se ponen en contacto con cloro. En este contexto, y a pesar de su ubicua presencia ¹⁰⁻¹³, no hay estudios que determinen si los carbohidratos son precursores de

THMs en condiciones habituales empleadas en la cloración ^{14,15}. Los carbohidratos son entre otros los biopolímeros más abundantes en aguas dulces y saladas ¹. Se ha demostrado que polisacáridos conteniendo grupos ácidos como los ácidos urónicos pueden ser excretados por algas y bacterias como respuesta al estrés producido por la falta de nutrientes ¹⁶. Considerando que las algas y bacterias pueblan todos los ecosistemas acuáticos, su capacidad de excretar polisacáridos origina que estos polímeros naturales se encuentren ampliamente distribuidos en todos los recursos acuáticos. Así, Hung y colaboradores ¹⁷ han descrito que las concentraciones de polisacáridos ácidos disueltos en aguas del Golfo de Méjico pueden representar hasta un 12% de la materia orgánica total en disolución. Por otra parte, Sweet y Perdue ¹⁸ han identificado glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, manosa, fructosa y ramnosa como componentes de la materia orgánica en varios ríos y lagos de Norte América. Además como se ha descrito en el capítulo anterior, nuestros estudios han puesto de manifiesto que los carbohidratos son una fracción importante (alrededor del 50 % en peso) de la materia orgánica disuelta del río Turia ¹⁹.

Como continuación de nuestra investigación sobre la influencia de la materia orgánica en disolución sobre los parámetros de calidad del agua, el presente capítulo describe que los sacáridos forman THMs de manera variable en función de la presencia de promotores y de las condiciones del tratamiento del agua. Estudios previos han demostrado que el pH, los bromuros y cloruros pueden afectar a la formación de THMs a partir de fenol ²⁰⁻²². Específicamente, en este Capítulo presentamos la influencia del pH y de la concentración de bromuros y cloruros en la cantidad de THMs formados a partir de una serie de mono- y oligosacáridos. Nuestro estudio es relevante para entender el origen de THMs en la cloración de materia orgánica en disolución durante el proceso de desinfección del agua durante el tratamiento de potabilización. El estudio es de particular interés en aquellos recursos hídricos donde los sacáridos representen un porcentaje significativo de la materia orgánica disuelta tal y como ha resultado ser en el agua del río Turia ¹⁹.

4.2. Formación de CHCl_3 en la cloración de carbohidratos a pH 8

Se seleccionó una serie de monosacáridos incluyendo aldosas y cetosas de 3 a 6 carbonos así como un disacárido y dos oligosacáridos como modelos para determinar la formación de THMs tras la cloración de disoluciones acuosas de laboratorio. Se fijó la concentración de disoluciones de sacáridos a 2 mg L^{-1} de carbono orgánico disuelto debido a que este valor no está lejos de los valores reales frecuentemente encontrados en los recursos acuáticos naturales al tiempo que permite una cuantificación reproducible de las concentraciones de THMs formadas. Como ejemplo, el agua del río Turia que es el recurso acuático natural para una población de 1.500.000 de habitantes tiene una concentración de carbohidratos alrededor de 1 mg L^{-1} . Otros experimentos se llevaron a cabo con concentraciones menores de sacáridos.

Los resultados obtenidos de potencial de formación de THMs (PFTHMs) en la cloración de sacáridos modelo se muestran en la Tabla 4.1. Hay que tener en cuenta que aunque el peso molecular y la concentración molar de cada sacárido en la Tabla 4.1 pueden ser diferentes, todas las disoluciones contienen la misma concentración de carbono disuelto (2 mg L^{-1}) y la razón C a Cl_2 ha sido mantenida para todos los sustratos. Así pues, puesto que el peso molecular del gliceraldehído y de la maltopentosa son 90 y 828 Da, respectivamente, las concentraciones para las disoluciones modelo de gliceraldehído y maltopentosa indicadas en la Tabla 4.1 son $0,055$ y $0,006 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, ambas disoluciones contienen el mismo contenido de carbono y han sido cloradas de acuerdo a este porcentaje carbono. Tal y como puede verse en la Tabla 4.1, todos los sacáridos dan elevados valores de THMs variando entre $83,0$ y $130,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. El único THM detectado fue CHCl_3 , un hecho fácilmente entendible considerando que se trata de disoluciones sintéticas en las cuales el bromo está ausente. Para poner los valores de la Tabla 4.1 en contexto debe mencionarse que las regulaciones legales actuales limitan el contenido de THMs en aguas potables a 80 y $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en EEUU¹³ y Unión Europea¹¹, respectivamente, y que aguas naturales tienen frecuentemente valores de carbono orgánico disuelto (COD) alrededor de 2 mg L^{-1} , una parte de los cuales son carbohidratos. En vista de estos datos puede decirse que para aquellos recursos acuáticos naturales conteniendo elevadas concentraciones de sacáridos, estos compuestos pueden contribuir significativamente a los THMs totales generados en el proceso de desinfección de aguas. También para dar una idea de la tendencia relativa de los sacáridos en la formación de THMs, la Tabla 4.1 contiene datos a partir de resorcinol a la misma concentración de COD que para los sacáridos, y trabajando bajo idénticas condiciones experimentales. Es conveniente remarcar que el resorcinol es el compuesto modelo preferido para los estudios de THMs y cuyos derivados se cree que son el origen de la mayor parte de los THMs en

aguas naturales. Considerando la elevada reactividad del resorcinol frente al cloro las condiciones empleadas en la Tabla 4.1 son deficientes en cloro debido a que este compuesto fenólico puede reaccionar incluso con mayores concentraciones de cloro. Sin embargo, a fin de establecer una comparación válida hemos mantenido constante la relación C/Cl para todos los ensayos de la Tabla 4.1. Incluso trabajando bajo las mismas condiciones, el resorcinol da una concentración de THMs un orden de magnitud mayor que cualquiera de los sacáridos. Sin embargo, el fenol que es un compuesto aromático menos activado origina en la cloración una concentración de THMs del mismo orden (aunque todavía mayor) que los sacáridos.

Tabla 4.1. Influencia del pH en el PFTHMs de algunos carbohidratos por cloración. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 µmoles) cloro libre, 20 °C, 72 h reacción.

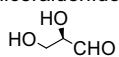
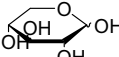
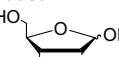
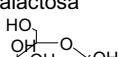
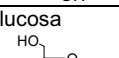
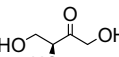
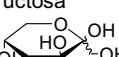
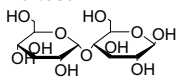
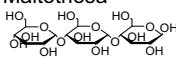
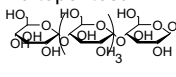


Columna →	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d	6 ^e	7 ^f
	pH	THM (µg L ⁻¹)	THM (µM)	Consumo de Cl ₂ (µM)	THMs/Carbo no_inicial _total Ratio molar (%)	Cl ₂ _consumido/THMs _formados Ratio molar (%)	Cloro consumido en THM (%)
MONOSACÁRIDOS							
ALDOSAS							
Gliceraldehído	11	81,7	0,68	85,7	0,39	125,4	2,4
	8	106,3	0,89	42,9	0,51	48,2	6,0
	5	19,2	0,16	14,0	0,06	84,8	3,5
Xilosa	11	110,3	0,92	32,9	0,55	35,6	8,4
	8	91,7	0,76	20,0	0,46	26,2	11,0
	5	14,9	0,12	7,0	0,07	56,2	5,3
Ribosa	11	110,3	0,92	35,7	0,54	38,7	7,7
	8	101,3	0,85	23,6	0,49	27,8	11,0
	5	21,6	0,18	12,9	0,11	74,6	4,0
Galactosa	11	116,1	0,97	37,1	0,56	38,2	7,8
	8	105,3	0,88	22,9	0,51	25,9	12,0
	5	1,2	0,01	12,7	0,01	1.228,5	0,2
Glucosa	11	125,5	1,05	40,0	0,63	38,1	7,9
	8	88,9	0,74	21,4	0,44	29,0	10,0
	5	16,1	0,14	7,0	0,08	52,8	5,7
CETOSAS							
Eritrulosa	11	91,1	0,76	64,3	0,39	84,3	3,5
	8	83,0	0,69	57,1	0,35	82,3	4,0
	5	37,5	0,31	15,7	0,16	50,6	5,9
Fructosa	11	133,7	1,12	57,1	0,66	51,06	5,8
	8	86,3	0,74	31,4	0,44	42,3	7,0
	5	17,3	0,14	22,5	0,08	167,3	1,8

Tabla 4.1 (continuación)

Columna →	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d	6 ^e	7 ^f
	pH	THM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	THM (μM)	Consumo de Cl_2 (μM)	THMs/Carbono inicial total Ratio molar (%)	Cl_2 consumido/THMs formados Ratio molar (%)	Cloro consumido en THM (%)
DISACÁRIDOS							
Maltosa	11	136,9	1,15	35,7	0,62	31,2	9,6
	8	106,7	0,89	24,3	0,48	27,2	11,0
	5	30,1	0,25	19,8	0,14	80,5	3,7
OLIGOSACÁRIDOS							
Maltotriosa	11	146,3	1,22	42,9	0,74	35,0	8,6
	8	130,8	1,09	27,9	0,66	24,7	12,0
	5	20,8	0,17	9,9	0,10	58,8	5,1
Maltopentosa	11	156,8	1,31	40,0	0,78	30,4	9,8
	8	125,3	1,05	28,6	0,63	27,3	11,0
	5	3,7	0,03	23,2	0,02	809,5	0,4
COMPUESTOS MODELO TRADICIONALES DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA							
Resorcinol							
	8	1.653	13,84	143,0	2,56	10,3	29,1
Fenol							
	8	271,9	2,28	143,0	0,36	62,8	4,7

^a Datos obtenidos por CG según el método estándar UNE-EN ISO 10301. El CHCl_3 es el principal componente de THMs, acompañado por un 5-7% de CHBrCl_2 proveniente de la contaminación por bromuros de los reactivos de cloro.

^b Obtenido de los datos de la columna 2.

^c Determinado por valoración con DPD.

^d Datos de la columna 3 divididos por la concentración de moles de carbono.

^e Datos obtenidos dividiendo la columna 4 por la columna 3.

^f Obtenido empleando los datos de la columna 3 dividida por la columna 4, en porcentaje.

Con el fin de ganar conocimiento sobre el grado de formación de THMs a partir de sacáridos, se determinó la cantidad total de THMs en micromoles y se refirió a la concentración inicial de carbono del sacárido (Tabla 4.1, columna 2). Se constató que a las 72 h de tiempo de contacto los THMs representan alrededor de un 0,5% del carbono inicial, calculado dividiendo 2 mg L^{-1} de C por el peso atómico del elemento C. Vale la pena comentar que la razón entre los micromoles de THMs por los micromoles de carbono es bastante constante (ver Tabla 4.1, columna 4) indicando que la tendencia a formar THMs

por átomo de carbono es constante e independiente del peso molecular o de la naturaleza mono ó oligomérica del sacárido. También es destacable que la razón molar THMs a carbono inicial es relativamente alto (alrededor de un 0,5% de media) para un proceso como es la formación de THMs que se cree que ocurre en un grado muy pequeño y que requiere numerosas reacciones consecutivas para llegar a la formación de THMs a partir de los sacáridos.

En relación con la cantidad de THMs formados y por tanto con el porcentaje de carbono inicial que reacciona con cloro, conviene comentar que los datos presentados en la Tabla 4.1 corresponden a un tiempo de contacto del sacárido con el cloro de 72 horas. Cuando el tiempo de contacto aumenta la cantidad de THMs aumenta hasta alcanzar un régimen estacionario. La Figura 4.2 muestra la evolución temporal de la formación de THMs para cuatro sacáridos seleccionados. Tal y como puede verse, la cantidad de THMs formados a tiempos de reacción superiores a 72 horas es mayor que los datos de la Tabla 4.1. En los casos de gliceraldehído y fructosa la cantidad de CHCl_3 formados alcanza un régimen estacionario a largos tiempos de contacto indicando que la reacción ha dejado de avanzar. El análisis de cloro residual al tiempo de contacto final indica que la razón por la cual la reacción no progresa más es el consumo casi total del cloro. Hay que mencionar que en los datos de la Tabla 4.1 a 72 h (ver columna 3, Tabla 4.1) el consumo de cloro estaba por debajo del 60% de la cantidad inicial. Otro punto de interés de la Figura 4.2 es que la velocidad inicial de reacción medida como la pendiente de la conversión con el tiempo a tiempo 0 es muy similar para los 4 sacáridos estudiados sugiriendo que la velocidad de reacción es relativamente independiente de la estructura del sacárido.

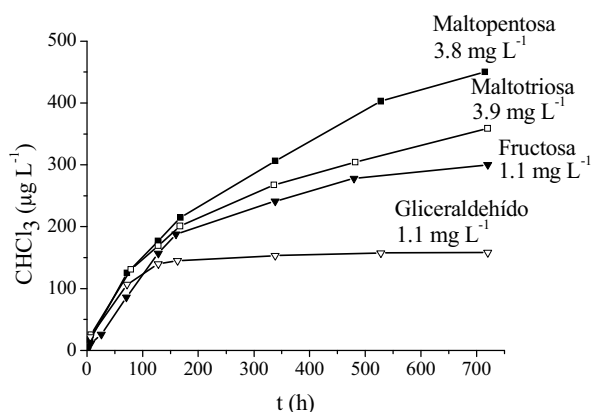


Figura 4.2. Evolución temporal de formación de CHCl_3 en el proceso de cloración de maltopentosa, maltotriosa, fructosa y gliceraldehído. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} ($143 \text{ } \mu\text{M}$) de cloro libre, pH 8, $20 \text{ } ^\circ\text{C}$. El número en la figura indica la concentración de Cl_2 correspondiente al último tiempo medido.

En párrafos anteriores hemos comentado la proporción entre el contenido de carbono inicial y la cantidad de THMs formados. Igual de interesante es determinar qué porcentaje de cloro consumido acaba como THMs. Para llevar a cabo este punto, hemos determinado el cloro consumido restando la concentración de cloro inicial y final (72 h) por valoración estándar de la DPD. La comparación entre la cantidad de Cl_2 consumido y la cantidad de CHCl_3 formado revela que la formación de THMs corresponde a un porcentaje mínimo del cloro consumido. Así, si todo el Cl_2 consumido se convirtiese en THM, la razón molar entre el cloro consumido y los THMs formados debería ser 3. Los datos de la razón molar de cloro consumido a THM formado también se muestran en la Tabla 4.1 (columna 5). Razones molares experimentales mayores de 3 indican que otros procesos, además de la formación de THMs, están teniendo lugar simultáneamente. Tal y como puede verse en la Tabla 4.1, la razón molar Cl_2 _consumido/THM es generalmente más de un orden de magnitud superior al número 3 esperado para la formación exclusiva de formación de THMs. Esto indica que la formación de THMs representa una parte menor (en torno a un 10%; Tabla 4.1, columna 6) del cloro total consumido. Estos datos demuestran que el cloro también está implicado en otros procesos además de la formación de THMs.

4.3 Influencia del pH en el PFTTHMs

En el punto anterior se ha descrito que monosacáridos incluyendo aldosas y cetosas, de tres a seis carbonos, al igual que di- y oligosacáridos a pH 8 en contacto con cloro dan lugar a la formación de THMs. Para estudiar la influencia del pH en el PFTTHMs, la cloración también se llevó a cabo en condiciones de pH más ácidas (pH 5) y básicas (pH 11). Estos valores de pH fueron seleccionados para el estudio porque comúnmente las aguas duras tienen un valor de pH cerca de 8 y los valores de pH 5 y 11 mostrarán la influencia de valores de pH menores y mayores con respecto a pH 8 como referencia. Los resultados están incluidos en la Tabla 4.1.

Como se puede ver en dicha tabla, la cloración a pH ácido claramente reduce la cantidad de THMs formados. Estudios previos en la literatura^{32,38} también han encontrado una influencia análoga del pH en el PFTTHMs, aunque empleando aguas naturales y no modelos de sacáridos en disolución tal y como hemos encontrado aquí. Al mismo tiempo la valoración del cloro consumido indica que la reducción del PTHMs a pH ácido es una consecuencia de la menor reactividad del cloro con los sacáridos a estos valores de pH. Por el contrario, a pH básico se incrementa el consumo de cloro en todos los casos, particularmente en el caso de los monosacáridos. Especialmente, en el caso del gliceraldehído y glucosa, los consumos de cloro a pH 11 son casi el doble que el consumo a pH 8. Además del gliceraldehído y la glucosa también para otros monosacáridos la

influencia del pH básico en el consumo de cloro es significativa. En general, un valor de pH de 11 también da lugar a un mayor PFTHMs comparado con pH 8. Sin embargo, no hay una relación lineal entre el incremento en el consumo de cloro y el mayor PFTHMs. Esto indica que además de la formación de THMs, también están teniendo lugar otros procesos de descomposición del cloro a pH 11. La explicación más probable es que al mismo tiempo que forma THMs el cloro también está produciendo la oxidación química del sacárido. En conjunto, los resultados de la Tabla 4.1 indican que valores de pH ácido desfavorecen fuertemente todo mecanismo de reacción del cloro incluyendo la formación de THMs. Por el contrario, la reactividad del cloro aumenta en gran medida por encima de pH 8.

La Tabla 4.1 también incluye una columna (número 5) que muestra qué porcentaje de los carbonos iniciales presentes en los sacáridos se transforman en THMs. Esta columna sigue la misma tendencia del PFTHMs, pero revela que sólo un pequeño porcentaje de los átomos iniciales de carbono (máximo 0,78%) se convierte en THMs. Este pequeño porcentaje de transformación de carbono ocurre aún a expensas de quedar cloro libre para reaccionar. Esto indica que la cinética de la reacción es lenta y a tiempo final (72 h) de acuerdo con la norma estándar para evaluar los valores de PFTHM³⁹ la reacción ha tenido lugar en un grado minúsculo. Así, se ha observado que a mayor tiempo de contacto entre el sustrato y el cloro la cantidad de THMs formada es mayor indicando que los procesos químicos que dan lugar a la formación de THMs no han concluido a las 72 h y continúan a tiempos más largos desde la adición de cloro (ver las figuras de las curvas de conversión frente al tiempo Figuras 4.2- 4.7).

Un punto interesante es el destino del cloro consumido. Tal y como revela la columna 6 de la Tabla 4.1, comparando la razón molar de cloro consumido y los THMs formados, la mayor parte del cloro que ha reaccionado no se convierte en THMs. Si todo el cloro consumido se hubiera convertido en THMs, la razón molar ideal $Cl_2_{consumido}/THM$ sería 3. Una razón molar $Cl_2_{consumido}/THM$ mayor de 3 indica que parte del cloro ha reaccionado sin formar THMs. Tal y como se puede ver en la columna 6 de la Tabla 4.1 la razón molar experimental $Cl_2_{consumido}/THM$ es considerablemente mayor de 3 indicando que, además de la formación de THMs, otros procesos están teniendo lugar predominantemente. La desviación de la razón molar $Cl_2_{consumido}/THM$ respecto al valor de 3 permite determinar qué porcentaje de cloro consumido acaba como THM. Estos valores también se muestran en la columna 7 de la Tabla 4.1. Teniendo en cuenta la reactividad general del cloro respecto a los sacáridos²³⁻²⁵, los procesos más razonables en los que se podría consumir cloro son la oxidación y la formación de productos clorados por sustitución C-H.

Con respecto a la influencia del pH en el porcentaje de cloro que acaba como THM, los datos experimentales (ver columna 6, Tabla 4.1) indican que pH 8 representa un máximo relativo en el porcentaje de cloro que acaba como THM. Valores de pH menores o mayores dan lugar a un menor porcentaje de cloro formando parte de los THM indicando que la reacción competitiva (oxidación y cloración) es más favorable a valores de pH extremos.

Con el fin de obtener información sobre el cloro consumido que no acaba como THM, procedimos a medir por cromatografía iónica la diferencia de cloruros en el medio de reacción, después de la reducción completa del cloro residual con AsO_2^- , entre el tiempo inicial y 72 h de reacción. NaAsO_2 es un reductor adecuado ²⁶ que, al contrario que el tiosulfato, no interfiere en la determinación de cloruros por cromatografía iónica. Los datos se muestran en las columnas 2 y 3 de la Tabla 4.2. La diferencia observada representa los átomos de cloro que están unidos a carbono bien como THM o bien como cualquier otro tipo de compuesto orgánico halogenado.

Tabla 4.2. Cloro consumido en la cloración de sacáridos. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 μM) cloro libre al inicio, 20°C, 72 h reacción.

Columna →	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d
	pH	Átomos de Cl ₂ consumidos totales (μM)	Cl ₂ acabando en oxidación (μM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (μM)	Cl ₂ acabando en THMs (μM)
MONOSACÁRIDOS					
<u>ALDOSAS</u>					
Gliceraldehído	11	85,7	81,91	3,80	2,05
	8	42,9	39,21	3,65	2,67
Xilosa	11	32,9	30,08	2,78	2,77
	8	20,0	17,69	2,31	2,29
Ribosa	11	35,7	32,89	2,83	2,77
	8	23,6	20,98	2,59	2,54
Galactosa	11	37,1	34,15	2,99	2,91
	8	22,9	20,19	2,67	2,64
Glucosa	11	40,0	36,79	3,21	3,15
	8	21,4	19,08	2,35	2,21
<u>CETOSAS</u>					
Eritrulosa	11	64,3	61,92	2,37	2,29
	8	57,1	55,04	2,10	2,08
Fructosa	11	57,1	52,01	5,13	3,36
	8	31,4	29,17	2,26	2,22
DISACÁRIDOS					
Maltosa	11	71,4	67,73	3,69	3,44
	8	48,6	45,87	2,70	2,68

Tabla 4.2 (Continuación)

Columna →	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d
	pH	Átomos de Cl ₂ consumidos totales (μM)	Cl ₂ acabando en oxidación (μM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (μM)	Cl ₂ acabando en THMs (μM)
OLIGOSACÁRIDOS					
Maltotriosa	11	42,9	38,96	3,90	3,67
	8	27,9	23,89	3,97	3,07
Maltopentosa	11	40,0	35,94	4,06	3,94
	8	28,6	25,41	3,16	3,15
COMPUESTOS MODELO TRADICIONALES DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA					
Resorcinol	8	143,0	90,59	52,26	41,51
Fenol	8	143,0	118,49	24,37	6,83

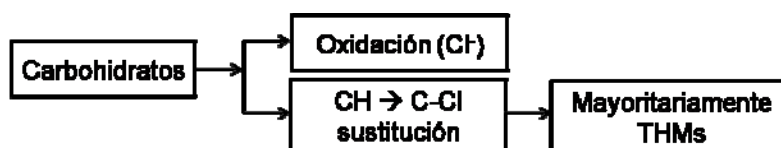
^a Estimado por cromatografía iónica. Reducción con NaAsO₂ a tiempo inicial

^b Estimado por reducción con NaAsO₂ a tiempo final (72 h)

^c Diferencia entre las columnas 2 y 3.

^d A partir de las medidas de THMs empleando CG.

El Esquema 4.1 muestra el balance de masa de los átomos de cloro en la cloración de sacáridos. La comparación entre los moles de cloro unidos a carbono con los moles de cloro que forman parte de los THMs (columnas 4 y 5, Tabla 4.2) indica que, aunque pequeñas cantidades de compuestos orgánicos halogenados pueden estar presentes en algunos casos (gliceraldehído y fructosa), la mayor parte del cloro unido a carbono a pH 11 y 8 está formando parte de los THMs. En cualquier caso, los datos de la columna 3 de la Tabla 4.2 indican claramente que el principal consumo de cloro no es la formación de THMs sino de iones cloruro lo cual corresponde a la reacción del cloro como agente oxidante. Este proceso de oxidación es más importante a pH básico. En este sentido, a pH ácido el consumo de cloro es tan bajo que no pueden llevarse a cabo medidas exactas debido a la pequeña cantidad de THMs que se forman en estas condiciones.



Esquema 4.1. Caminos de reacción del Cl₂ como agente oxidante (dando lugar a iones cloruro) o como agente de halogenación sobre C-H (dando lugar a la desaparición de átomos de cloro de la disolución).

4.4 Influencia de la presencia de cloruros en el PFTHMs

El objetivo principal de este capítulo es demostrar que en el proceso de cloración de aguas naturales, la presencia de sacáridos contribuye a la formación de THMs. En este contexto y considerando que un agua natural además de sacáridos puede tener otros componentes que pueden actuar como promotores de la cloración, es de interés estudiar la influencia de los iones cloruro como agentes promotores de la formación de THMs a partir de sacáridos.

Tabla 4.3. Influencia de los cloruros en el PFTHMs de algunos carbohidratos. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 µM) cloro libre al inicio, 20 °C, 72 h reacción

Columna →	1 ^a	2 ^b	3	4	5	6	7
	[Cl] mg L ⁻¹	THM (µg L ⁻¹)	THM µM	Cl ₂ consumido (µM)	THMs/Carb ono_inicial _total Razón molar (%)	Cl ₂ _consumid o/THMs_form ados Razón molar (%)	Cloro consumid o en THM (%)
MONOSACÁRIDOS							
<i>ALDOSAS</i>							
	0	106,3	0,89	42,9	0,51	48,2	6,0
Gliceraldehído	100	153,8	1,28	42,9	0,73	33,5	8,96
	200	168,6	1,41	42,9	0,81	30,4	9,87
	0	101,3	0,85	23,6	0,49	27,8	11,0
Ribosa	100	120,8	1,01	23,6	0,59	27,47	10,9
	200	134,2	1,12	23,6	0,66	23,32	12,9
	0	105,3	0,88	22,9	0,51	25,95	12,0
Galactosa	100	123,1	1,03	22,9	0,60	22,09	13,6
	200	123,3	1,04	22,9	0,60	22,04	13,6
	0	88,9	0,74	21,4	0,44	29,0	10,0
Glucosa	100	129,9 ^c	1,09 ^c	21,4	0,65	19,7	15,2
	200	123,4 ^c	1,03 ^c	21,4	0,62	20,7	14,4
<i>CETOSAS</i>							
	0	83,0	0,69	57,1	0,35	82,3	4,0
Eritrulosa	100	131,1	1,05	57,1	0,54	54,2	5,5
	200	146,2	1,22	57,1	0,62	46,7	6,4
	0	86,3	0,74	31,4	0,44	42,3	7,0
Fructosa	100	147,9	1,24	31,4	0,73	25,4	11,8
	200	155,3	1,30	31,4	0,77	24,2	12,4

Tabla 4.3 (Continuación)

Columna →	1 ^a [Cl] mg L ⁻¹	2 ^b THM (µg L ⁻¹)	3 THM µM	4 Cl ₂ consumido (µM)	5 THMs/Carb ono_inicial _total Razón molar (%)	6 Cl ₂ _consumido/THMs_ formados Razón molar (%)	7 Cloro consumido en THM (%)
DISACÁRIDO							
Maltosa	0	106,7	0,89	24,3	0,48	27,2	11,0
	100	125,5	1,05	25,0	0,57	23,8	12,6
	200	138,0	1,16	25,0	0,62	21,6	13,8
OLIGOSACÁRIDOS							
Maltotriosa	0	130,8	1,09	27,9	0,66	24,7	12,0
	100	143,1	1,20	27,9	0,73	23,1	13,0
	200	149,3	1,25	27,9	0,76	22,3	13,4
Maltopentosa	0	125,3	1,05	28,6	0,63	27,3	11,0
	100	143,2	1,20	28,6	0,72	23,8	12,6
	200	153,5	1,28	28,6	0,77	22,2	13,5

^a Concentración inicial añadida a las disoluciones modelo

^b El THM predominante es CHCl₃ acompañado por un 5-7% de CHBrCl₂ proveniente del bromuro presente en los reactivos de NaCl y NaOCl.

^c Estos valores se consideran idénticos dentro del margen de error

Se ha descrito que la presencia de iones cloruro favorece la formación de THMs en el caso de compuestos fenólicos³⁴. Por esta razón es de interés determinar si trabajando con sacáridos como sustratos, aumenta también el PFTHMs cuando los iones cloruro están presentes en un rango de concentraciones típicamente encontradas en el agua dulce natural. Los resultados obtenidos para el PFTHMs a partir de la serie de sacáridos objeto de estudio están incluidos en la Tabla 4.3. Tal y como puede verse en la Tabla 4.3, en la mayoría de los casos el PFTHMs para un tiempo de contacto de 72 h aumenta con la concentración de cloruros. En algunos casos como gliceraldehído, eritrosa y fructosa el incremento de THM sobrepasa el 60%

Con respecto a la manera en la cual los iones cloruro promueven la formación de THMs hay que comentar que este incremento de THMs tiene lugar sin un aumento en el consumo de cloro. Realmente, tal y como se muestra en la columna 4 de la Tabla 4.3 el consumo de cloro es casi independiente de la presencia de los cloruros. El hecho que los iones cloruro promueven la formación de THMs sin aumentar el consumo de cloro se refleja en las columnas 5 y 6 (Tabla 4.3), donde se presenta la razón molar THM/carbono_inicial_total y la razón molar Cl₂_consumido/THM, observándose una mejora de estos parámetros con la concentración de cloruro. Así pues, incrementando la concentración de cloruros existe una tendencia general a aumentar el porcentaje de THM frente al carbono inicial total. Sin embargo, merece ser comentado que incluso en presencia

de iones cloruro menos del 1 % del carbono inicial acaba como THM a las 72 h a pesar de que queda todavía más de la mitad del cloro inicial por reaccionar. Esto indica que la reacción es lenta y que probablemente se formaría mayor cantidad de THMs con tiempos de contacto mayores (ver las cinéticas de reacción, Figuras 4.2-4.7). La columna 6 de la Tabla 4.3 también muestra que aunque el porcentaje de cloro que acaba como THM aumenta con la concentración de cloruros, el principal consumo de cloro no es la formación de THM. Idealmente, si todo el consumo de cloro estuviese formando THMs la razón molar $Cl_2_{consumido}/THM_{formado}$ debería ser 3. Cuanto mayor es esta razón, mayor es el porcentaje de consumo de cloro que no forma parte de THMs. Finalmente, la columna 7 de la Tabla 4.3 muestra el porcentaje de átomos de cloro que forman parte de THMs. Tal y como puede verse en la Tabla 4.3, este porcentaje aumenta con la presencia de iones cloruro pero todavía está lejos de la incorporación total del cloro consumido en los THM. Por otra parte, empleando la técnica de cromatografía iónica y basándose en la diferencia entre la concentración de cloruros después de reducir el Cl_2 en el medio de reacción al inicio y con tiempos de contacto de 72 h, se determina que el cloro que forma parte de los THMs (Tabla 4.4, columna 5) representa prácticamente todo el Cl_2 que acaba unido a carbono (Tabla 4.4, columna 4). Este hecho indica que en la cloración de sacáridos la presencia de otros compuestos halogenados, a parte de los THMs, es insignificante.

Tabla 4.4. Cloro consumido en la cloración de sacáridos. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 μM) cloro libre, 20 °C, 72 h reacción.

Columna→	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e
	Cloruros (mg L ⁻¹)	Átomos de Cl ₂ totales consumidos (μM)	Cl ₂ acabando en oxidación (μM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (μM)	Cl ₂ acabando en THMs (μM)
MONOSACÁRIDOS					
<u>ALDOSAS</u>					
	0	85,8	81,16	4,55	2,67
Gliceraldehído	100	85,8	81,63	4,08	3,82
	200	85,8	81,63	4,08	4,23
	0	47,2	44,55	2,59	2,54
Ribosa	100	47,2	43,95	3,20	3,03
	200	47,2	43,68	3,46	3,37
	0	45,8	43,05	2,67	2,64
Galactosa	100	45,8	42,43	3,28	3,12
	200	45,8	42,37	3,34	3,13
	0	42,8	40,56	2,29	2,21
Glucosa	100	42,8	39,54	3,32	3,26
	200	42,8	39,67	3,18	3,10
<u>CETOSAS</u>					
	0	114,2	112,18	2,10	2,08
Eritrulosa	100	114,2	110,44	3,85	3,04
	200	114,2	110,16	4,12	3,67

Tabla 4.4. (Continuación)

Columna→	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e
	Cloruros (mg L ⁻¹)	Átomos de Cl ₂ totales consumidos (μM)	Cl ₂ acabando en oxidación (μM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (μM)	Cl ₂ acabando en THMs (μM)
Fructosa	0	62,8	60,59	2,26	2,22
	100	62,8	59,03	3,83	3,71
	200	62,8	58,90	3,90	3,90
DISACÁRIDO					
Maltosa	0	48,6	45,87	2,70	2,68
	100	48,6	46,60	3,40	3,15
	200	48,6	46,50	3,50	3,47
OLIGOSACÁRIDOS					
Maltotriosa	0	55,8	52,60	3,11	3,07
	100	55,8	51,91	3,81	3,62
	200	55,8	51,67	4,05	3,75
Maltopentosa	0	57,2	53,98	3,16	3,15
	100	57,2	53,43	3,71	3,60
	200	57,2	53,35	3,85	3,85

4.5 Influencia de la presencia de bromuros en el PFTHMs

Además de los iones cloruro, es sabido que la presencia de iones bromuro, incluso a concentraciones muy bajas, promueve la formación de THMs^{21,27,28}. El bromuro es un ión generalmente presente en los recursos acuáticos naturales, aunque en una concentración mucho menor que el ión cloruro. Con el fin de estudiar la influencia de los iones bromuro en el PFTHMs de sacáridos se llevó a cabo la cloración en presencia de varias concentraciones diferentes de bromuro. Las concentraciones empleadas están en el rango de μg L⁻¹ y son valores comunes de bromuros en aguas naturales. En la Tabla 4.5 se muestran los resultados obtenidos relativos al PFTHMs para tiempos de contacto de 72 h trabajando con en presencia de bromuro.

En la Tabla 4.5 (columna 2 y 3), se puede ver que la presencia de iones bromuro (en μg L⁻¹) aumenta en gran medida la cantidad de THMs formados. Según lo anticipado, basado en estudios previos^{29,30} el ión bromuro es significativamente más eficiente que el ión cloruro promoviendo la formación de THMs (comparar Tablas 4.3 y 4.5). También se ha observado que tal y como se ha comentado en el caso de los cloruros, el aumento del PFTHMs no ocurre generalmente a expensas de un aumento del consumo de cloro (Tabla 4.5, columna 4). En la Tabla 4.6 se encuentran los datos relativos a la influencia del ión bromuro en el porcentaje de cloro que se consume en procesos de oxidación respecto al cloro que interviene en procesos de sustitución.

Tabla 4.5. Influencia del bromuro en el PTHMs de algunos carbohidratos bajo cloración.
Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 µM) cloro libre, 20°C, 72 h reacción

Columna →	1 ^a	2	3	4	5	6	7
	[Br ⁻] (µg L ⁻¹)	THM (µg L ⁻¹)	THM µM	Cl ₂ consumido (µM)	THMs/Carb ono_inicial _total Ratio molar (%)	Cl ₂ _consumid o/THMs_ form ados Ratio molar (%)	Cloro consumid o en THM (%)
MONOSACÁRIDOS							
ALDOSAS							
	0	106,3	0,89	42,9	0,51	48,2	6,0
Gliceralde hído	50	156,5	1,08	45,7	0,62	42,4	5,6
	100	222,3	1,44	50,0	0,82	34,8	6,2
	300	365,5	2,00	50,0	1,14	25,0	6,2
	0	108,2	0,91	21,0	0,54	23,2	12,9
Manosa	50	136,1	1,06	21,0	0,63	19,9	14,0
	100	165,6	1,25	21,0	0,74	16,7	16,1
	300	170,3	-	21,0	0,57	21,6	7,8
	0	101,5	0,85	18,6	0,51	21,8	13,7
Inositol	50	159,5	1,22	18,6	0,70	15,3	17,9
	100	181,7	1,37	18,6	0,82	13,6	19,8
	300	196,9	1,16 ^b	20,0	0,69	17,3	10,5
	0	91,7	-	20,0	0,46	26,2	11,0
Xilosa	50	93,2	0,61	20,0	0,37	32,7	6,8
	100	116,5	0,72	20,0	0,43	27,7	7,3
	300	171,8	0,93	20,0	0,55	21,5	6,9
	0	101,3	0,85 ^b	23,6	0,49	27,8	10,8
Ribosa	50	126,2	0,84	23,6	0,49	28,2	8,0
	100	127,6	0,81 ^b	23,6	0,48	29,1	7,2
	300	146,6	0,86	23,6	0,50	27,5	6,6
	0	105,3	0,88	22,9	0,51	25,9	11,6
Galactosa	50	134,3	0,91	22,9	0,53	25,2	9,2
	100	153,5	0,97	22,9	0,56	23,7	8,8
	300	189,4	1,08	22,9	0,63	21,2	8,0
	0	88,9	0,74	21,4	0,44	29,0	10,0
Glucosa	50	91,0	0,61	21,4	0,36	35,1	6,5
	100	109,3	0,69	21,4	0,41	31,0	6,7
	300	177,8	1,03	21,4	0,61	20,9	8,4
CETOSAS							
	0	83,0	0,69	57,1	0,35	82,3	3,7
Eritrulosa	50	118,3	0,86	57,4	0,44	66,9	3,8
	100	128,1	0,90	57,5	0,45	64,3	3,8
	300	177,6	1,00	57,8	0,50	58,1	2,8
	0	86,3	0,74	31,4	0,44	42,3	7,0
Fructosa	50	95,1	0,65 ^b	31,4	0,38	48,5	4,8
	100	103,2	0,66 ^b	31,4	0,39	47,7	4,5
	300	159,8	0,92	31,4	0,55	33,9	5,2
DISACÁRIDO							
	0	106,7	0,89	24,3	0,48	27,2	11,0
Maltosa	50	142,6	0,98	25,7	0,53	26,3	9,05
	100	167,4	1,06	25,7	0,57	24,4	8,5
	300	237,6	1,36	28,6	0,73	21,0	8,1

Tabla 4.5. (Continuación)							
Columna →	1 ^a	2	3	4	5	6	7
	[Br] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	THM ($\mu\text{g L}^{-1}$)	THM μM	Cl ₂ consumido (μM)	THMs/Carb ono_inicial _total Ratio molar (%)	Cl ₂ _consumid o/THMs_ form ados Ratio molar (%)	Cloro consumid o en THM (%)
OLIGOSACÁRIDOS							
Maltotriosa	0	130,8	1,09	27,9	0,66	24,7	11,0
	50	145,0	0,98 ^b	27,9	0,59	28,3	8,3
	100	169,4	1,06 ^b	27,9	0,64	26,2	7,8
	300	259,1	1,45	27,9	0,89	19,2	8,5
Maltopentosa	0	125,3	1,05	28,6	0,63	27,3	11,0
	50	159,3	1,14	28,6	0,68	25,03	10,1
	100	152,2	0,96 ^b	28,6	0,57	29,95	6,9
	300	175,6	1,01 ^b	32,9	0,61	32,60	5,3

^a Concentración inicial añadida a la disolución modelo
^b Estos variaciones se consideran estar dentro del margen de error

Como se ha comentado previamente para el caso del ión cloruro promoviendo la formación de THMs, también la presencia de ión bromuro aumenta el porcentaje del carbono inicial total que se transforma en THMs (ver columna 5, Tabla 4.5). Aunque ese porcentaje de átomos de carbono transformados en THMs es bajo en un caso sobrepasa el 1%. Asimismo, aunque la cantidad de THMs puede ser relativamente muy alta, la mayor parte del cloro consumido no acaba como THMs (columnas 6 y 7, Tabla 4.5).

Tabla 4.6. Cloro consumido en la cloración de sacáridos en presencia de bromuro. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 μM) cloro libre, 20 °C, 72 h reacción.						
Columna ->	1	2	3	4	5	6
	[Br] ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Átomos de Cl ₂ totales consumid os (μM)	Cl ₂ acabando en oxidación (μM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (μM)	Cl ₂ acabando en THMs (μM)	Bromuro incorporado en THMs ($\mu\text{g L}^{-1}$)
MONOSACÁRIDOS						
ALDOSAS						
Gliceralde- hído	0	85,8	81,16	4,55	2,67	-
	50	91,4	86,72	4,71	3,38	50,0
	100	100,0	96,60	3,40	3,12	91,7
	300	100,0	96,2	3,80	3,09	228,9
Xilosa	0	40,0	37,69	2,31	2,29	-
	50	40,0	38,52	1,48	1,36	36,7
	100	40,0	38,49	1,51	1,46	55,0
	300	40,0	38,22	1,78	1,37	110,5
Ribosa	0	47,2	44,55	2,59	2,54	-
	50	47,2	45,18	1,96	1,90	47,5
	100	47,2	45,38	1,76	1,70	56,1
	300	47,2	45,36	1,79	1,55	80,0

Tabla 4.6 (continuación)						
Columna ->	1	2	3	4	5	6
	[Br ⁻] (µg L ⁻¹)	Átomos de Cl ₂ totales consumidos (µM)	Cl ₂ acabando en oxidación (µM)	Cl ₂ acabando unido a carbono (µM)	Cl ₂ acabando en THMs (µM)	Bromuro incorporado en THMs (µg L ⁻¹)
Galactosa	0	45,8	43,05	2,67	2,64	-
	50	45,8	43,43	2,29	2,21	47,6
	100	45,8	43,68	2,03	2,00	69,1
	300	45,8	43,81	1,90	1,83	109,8
CETOSAS						
Eritrulosa	0	114,2	112,18	2,10	2,08	-
	50	114,8	111,84	3,02	2,24	28,7
	100	115,0	111,72	3,43	2,50	38,4
	300	115,6	112,27	3,44	1,63	106,4
Fructosa	0	62,8	60,59	2,26	2,22	-
	50	62,8	60,51	2,34	1,53	32,1
	100	62,8	59,55	3,31	1,40	44,5
	300	62,8	58,34	4,52	1,63	89,6
DISACÁRIDO						
Maltosa	0	48,6	45,87	2,70	2,68	-
	50	51,4	48,94	2,49	2,33	46,7
	100	51,4	48,95	2,48	2,20	75,1
	300	57,2	54,74	2,40	2,31	137,2
OLIGOSACÁRIDOS						
Maltoriosa	0	55,8	52,60	3,11	3,07	-
	50	55,8	53,24	2,48	2,31	49,7
	100	55,8	53,06	2,65	2,31	70,1
	300	55,8	52,09	3,62	2,38	154,9
Maltopento- sa	0	57,2	53,98	3,16	3,15	-
	50	57,2	53,51	3,63	3,40	48,6
	100	57,2	53,54	3,61	2,97	99,2
	300	65,8	61,50	4,22	3,18	229,4

Un punto de interés es la distribución de THMs en los experimentos en presencia del ión bromuro. La comparación de THMs cuando la cloración se lleva a cabo en presencia de iones bromuro se muestra en la Tabla 4.7. En los casos anteriores, debido a que el cloro era el único halógeno presente en las disoluciones, el THM predominante era el CHCl₃ acompañado con un pequeño porcentaje (5-7%) de CHBrCl₂ proveniente de las impurezas de bromuro presentes en los reactivos de cloro. En general, cuando el ión bromuro se añadió al agua a la concentración estudiada, la concentración de CHBr₃ fue cero excepto para la mayor concentración de bromuro estudiada. Frecuentemente CHBrCl₂ fue el mayor componente de la mezcla de THMs (ver Tabla 4.7). Esta distribución de THMs puede ser racionalizada basada en la razón atómica relativa Cl/Br y en la incorporación más rápida del bromo con respecto al cloro^{30,31}.

Tabla 4.7. Distribución de THMs en la cloración de sacáridos en presencia de bromuro. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 µM) cloro libre, 20°C, 72 h reacción.

	[Br] ₀ (µ L ⁻¹)	CHCl ₃ (µ L ⁻¹)	CHBrCl ₂ (µ L ⁻¹)	CHClBr ₂ (µ L ⁻¹)	CHBr ₃ (µ L ⁻¹)
MONOSACÁRIDOS					
ALDOSAS					
Gliceraldehído	0	106,3	0,0	0,0	0,0
	50	58,8	88,1	9,6	0,0
	100	33,0	189,3	0,0	0,0
	300	10,7	168,9	159,7	26,2
Manosa	0	108,2	0,0	0,0	0,0
	50	99,5	36,7	0,0	0,0
	100	106,7	58,9	0,0	0,0
	300	13,8	80,1	67,2	9,2
Inositol	0	101,5	0,0	0,0	0,0
	50	107,5	51,9	0,0	0,0
	100	114,4	67,3	0,0	0,0
	300	14,0	119,0	63,9	0
Xilosa	0	91,1	0,0	0,0	0,0
	50	24,6	56,3	12,3	0,0
	100	16,2	77,7	22,7	0,0
	300	6,0	72,4	71,6	21,8
Ribosa	0	101,3	0,0	0,0	0,0
	50	39,2	68,1	19,0	0,0
	100	23,1	85,3	19,3	0,0
	300	14,2	75,9	56,5	0,0
Galactosa	0	105,3	0,0	0,0	0,0
	50	43,1	79,3	12,0	0,0
	100	22,2	111,7	19,6	0,0
	300	10,2	103,4	66,6	9,2
Glucosa	0	88,0	0,0	0,0	0,0
	50	27,9	54,8	8,3	0,0
	100	19,0	73,2	17,1	0,0
	300	10,3	99,9	67,5	0,0
CETOSAS					
Eritrulosa	0	83,0	0,0	0,0	0,0
	50	59,2	59,2	0,0	0,0
	100	49,0	79,1	0,0	0,0
	300	16,5	72,3	70,3	18,5
Fructosa	0	88,6	0,0	0,0	0,0
	50	31,6	59,0	4,6	0,0
	100	19,3	70,3	13,7	0,0
	300	20,9	69,0	55,2	14,7
DISACÁRIDOS					
Maltosa	0	106,7	0,0	0,0	0,0
	50	51,5	82,1	9,1	0,0
	100	28,7	110,9	27,9	0,0
	300	23,4	105,1	94,2	14,9
OLIGOSACÁRIDOS					
Maltotriosa	0	122,4	0,0	0,0	0,0
	50	46,8	90,4	7,8	0,0
	100	29,2	119,0	28,0	0,0
	300	16,5	122,9	99,7	20,1
Maltopentosa	0	125,3	0,0	0,0	0,0
	50	92,7	84,3	10,1	0,0
	100	43,2	138,9	41,7	0,0
	300	11,3	176,2	158,3	24,2

Respecto a la evolución temporal de THMs, las curvas de conversión frente a tiempo analizando THMs a diferentes tiempos de contacto, muestran que todos los THMs son productos primarios y estables, puesto que todos se observan a tiempos cortos de reacción con una distribución similar. Esto indica que no hay interconversión entre THMs bajo las condiciones estudiadas y que se forman de manera independiente con velocidades de reacción relativa constantes³². Las Figura 4.3 ilustra la evolución temporal de THMs en función de la concentración inicial de bromuro para los casos del gliceraldehído, la fructosa, la maltotriosa y la maltopentosa. Además las Figuras 4.4-4.7 muestran la evolución temporal individual de cada THM individual en presencia de diferentes cantidades de ión bromuro para los casos de gliceraldehído, fructosa, maltotriosa y maltopentosa.

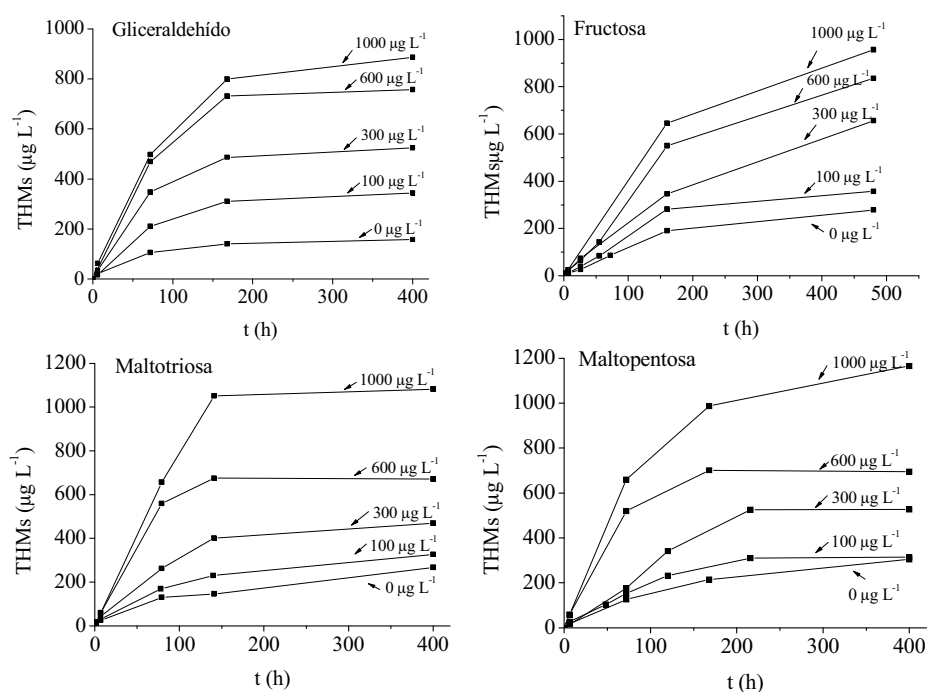


Figura 4.3. Influencia de la concentración inicial de bromuro en el PFTHMs. Condiciones de reacción: 2 mg L⁻¹ COD, 10 mg L⁻¹ (143 µM) cloro libre, 20 °C.

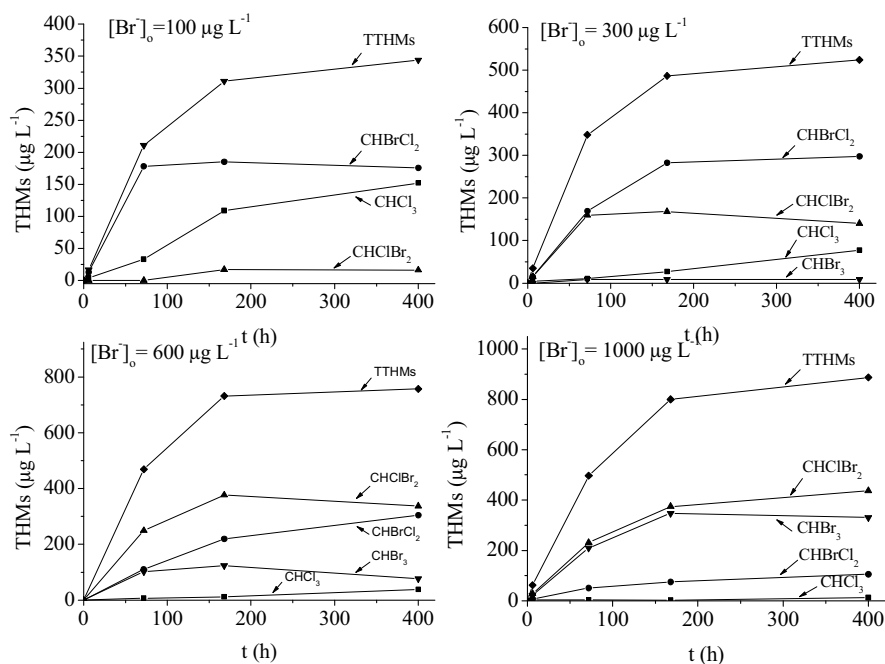


Figura 4.4. Evolución de cada THM individual en la cloración de gliceraldehído en presencia de Br^- como precursor. La concentración de Br^- está indicada en cada gráfica. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} (143 μM) cloro libre, 20 °C. El acrónimo TTHMs corresponde a la suma de las concentraciones de los THM individuales.

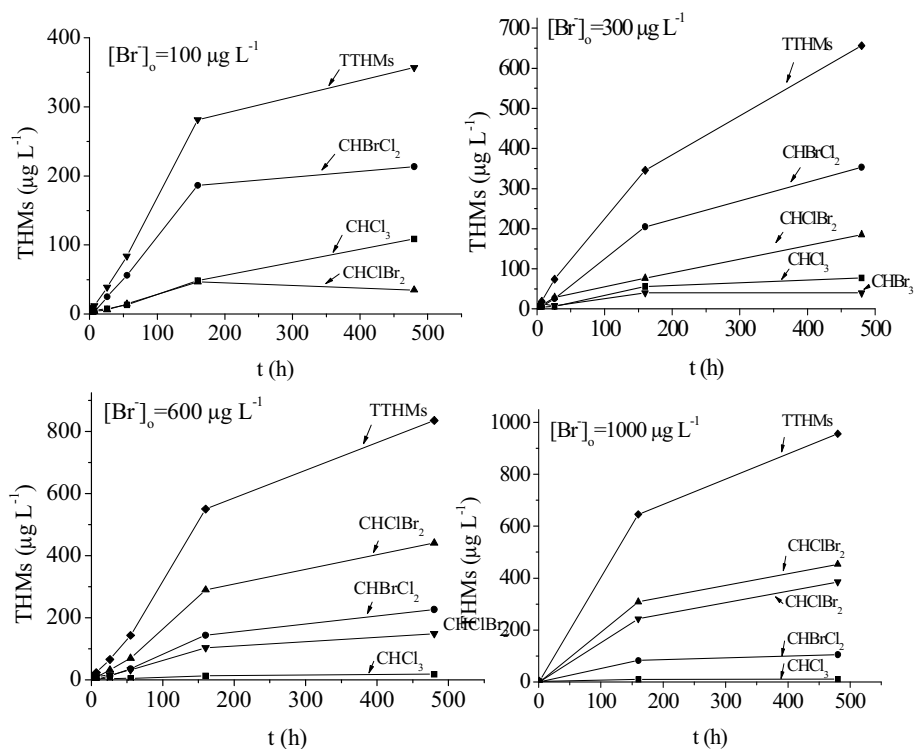


Figura 4.5. Evolución de cada THM individual en la cloración de fructosa en presencia de Br^- como precursor. La concentración de Br^- está indicada en cada gráfica. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} ($143 \mu\text{M}$) cloro libre, 20°C . El acrónimo TTHMs corresponde a la suma de las concentraciones de los THM individuales.

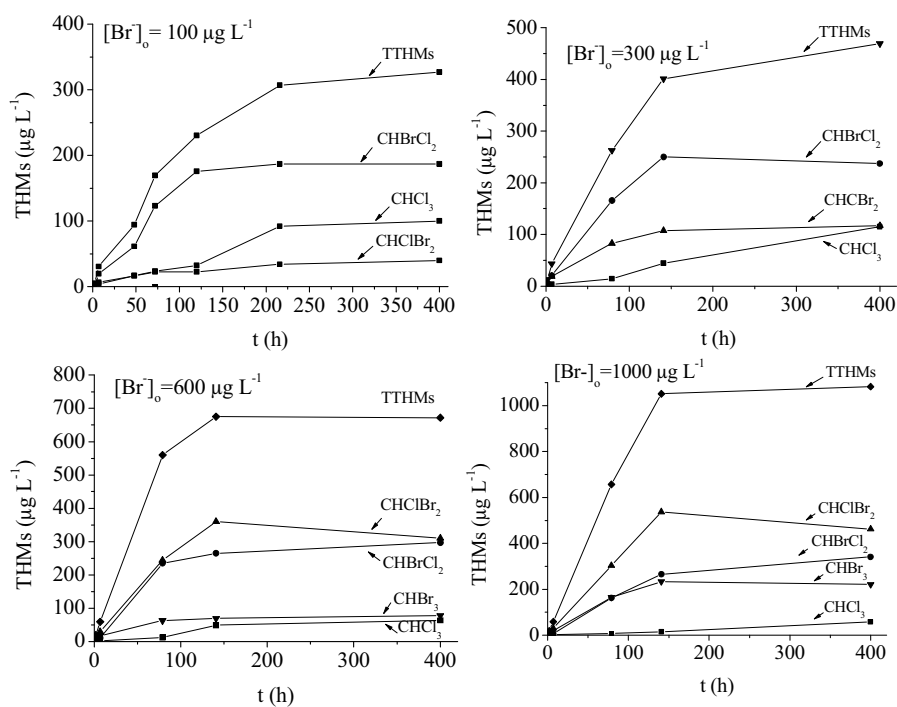


Figura 4.6. Evolución de cada THM individual en la cloración de maltotriosa en presencia de Br^- como precursor. La concentración de Br^- está indicada en cada gráfica. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} ($143 \mu\text{M}$) cloro libre, $20 \text{ }^\circ\text{C}$. El acrónimo TTHMs corresponde a la suma de las concentraciones de los THM individuales.

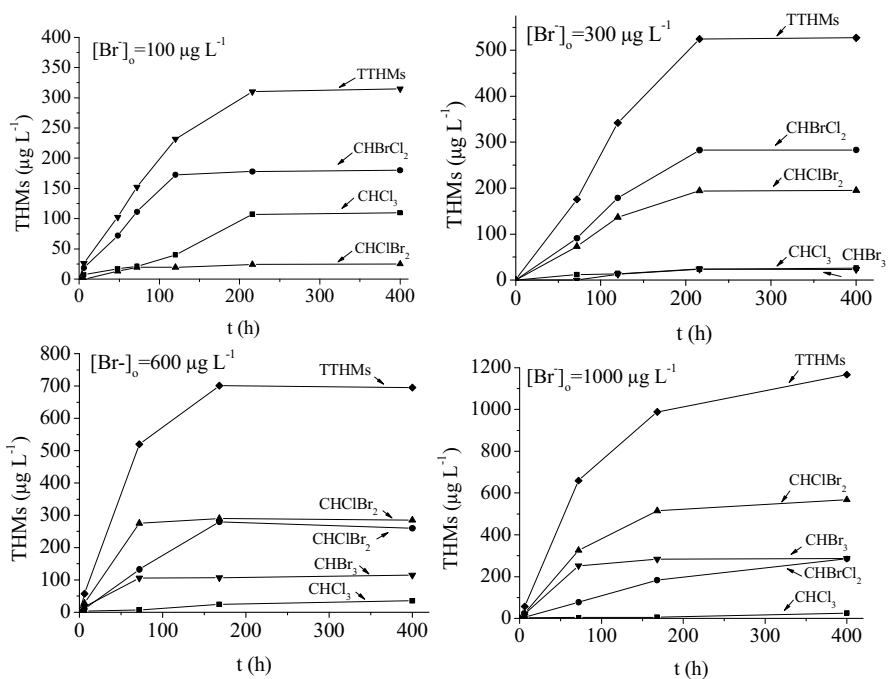


Figura 4.7. Evolución de cada THM individual en la cloración de maltopentosa en presencia de Br^- como precursor. La concentración de Br^- está indicada en cada gráfica. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} (143 μM) cloro libre, 20 °C. El acrónimo TTHMs corresponde a la suma de las concentraciones de los THM individuales.

Con respecto al destino del bromuro y relacionado con la forma en la que la formación de THMs está promovida por la presencia de bromuro, el balance de masas del contenido de bromuro presente en los THMs ($\text{CHBrCl}_2 + 2\text{CHBr}_2\text{Cl} + 3\text{CHBr}_3$) a tiempos de contacto largos indica que un porcentaje elevado del bromuro inicial se ha unido a carbono formando parte de los THMs bromados. La Figura 4.8 muestra para cada concentración inicial de bromuro la fracción que corresponde a las 400 h de cloración a trihalometanos bromados. Tal y como se puede ver en dicha figura, en algunos casos, la incorporación del bromuro inicial en los THMs es casi completa.

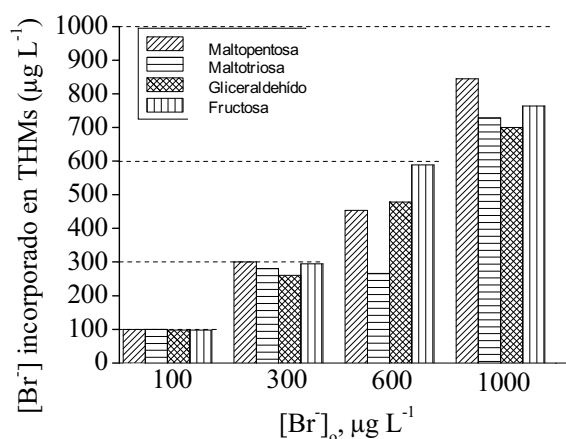


Figura 4.8. Incorporación de bromuro en THMs a tiempo final de reacción (400 h) para algunos sacáridos en función de $[\text{Br}^-]_0$. Condiciones de reacción: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} ($143 \text{ } \mu\text{M}$) cloro libre inicial, $20 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Una información interesante respecto a la influencia de los iones bromuros en el PFTHMs se obtiene al representar la velocidad inicial de reacción (r_0) frente a la concentración inicial de bromuro. r_0 se determina a partir de la pendiente de la curva de la evolución temporal del total de THMs (ver Figura 4.3).

Para todos los sacáridos objeto de estudio se observaron tendencias similares. La Figura 4.9 ilustra la influencia de la concentración inicial de bromuro en la r_0 del PFTHMs. Como puede verse en esta figura, r_0 aumenta con la $[\text{Br}^-]_0$. Las curvas mostradas en la Figura 4.9 sugieren una cinética de primer orden con respecto a la concentración de bromuro, $r_0 = r_{\text{app}}[\text{Br}^-]_0$ indicando que el ión bromuro acelera la reacción interviniendo en las etapas determinantes del mecanismo de reacción.

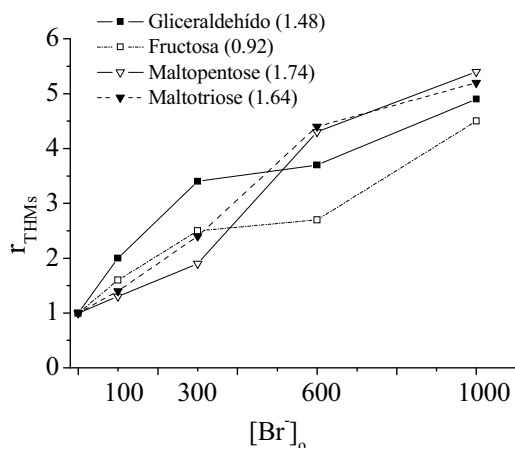
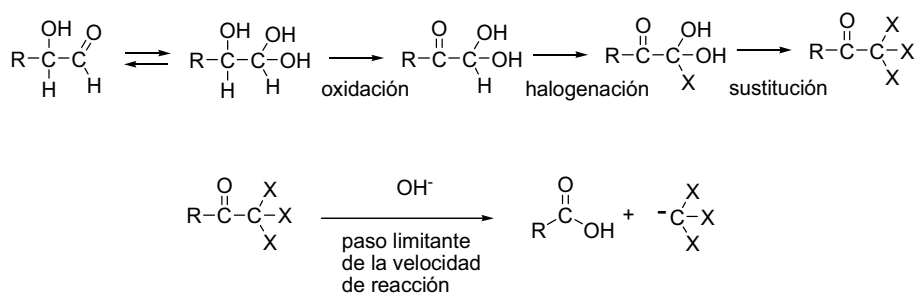


Figura 4.9. Influencia de la concentración inicial de bromuro en la velocidad inicial de formación de THMs (r_0). Los datos de los diferentes sacáridos han sido normalizados en el experimento con $0 \mu\text{g L}^{-1}$ de iones bromuro. El número entre paréntesis indica la velocidad inicial de reacción en ausencia de bromuro.

En vista de los datos disponibles, como por ejemplo la no influencia del cloro consumido por $[\text{Br}^-]_0$, la relación casi-lineal entre r_0 y $[\text{Br}^-]_0$ y que la mayor parte del bromuro inicial acaba como productos de reacción, proponemos que los bromuros promueven la formación de THMs sin intervenir en reacciones de oxidación, probablemente promoviendo la ruptura del enlace C-C dando lugar a THMs³³. Podría ser que el bromuro influyera aumentando la estabilidad del haloformo como la reacción que da lugar a los THMs puesto que en ese mecanismo se forma un carbanión halogenado. Es conocido que los carbaniones metílicos bromados (CBr_3^-) son más estables que los clorados (CCl_3^-)³³. El Esquema 4.2 resume el mecanismo propuesto basado en la estabilidad relativa de carbaniones halogenados.



estabilidad del grupo saliente: $\text{CBr}_3^- > \text{CBr}_2\text{Cl}^- > \text{CBrCl}_2^- > \text{CCl}_3^-$

Esquema 4.2. Propuesta simplificada para justificar el efecto de promoción del ión bromuro en la formación de THMs favoreciendo la rotura del enlace C-C a partir de α -hidroxialdehídos (estructura de sacárido más simple).

4.6 Conclusiones

Considerando que los sacáridos así como los iones cloruro y bromuro están presentes en las aguas naturales, el presente estudio es relevante para el conocimiento del origen de los THMs en el proceso de desinfección del agua con cloro. Así en aguas naturales, la existencia de una elevada concentración de oligo-/polisacáridos, junto con agentes promotores como cloruros y bromuros, podría originar un porcentaje elevado de THMs cuando el agua de estas características es sometida a desinfección utilizando hipoclorito.

4.7 Referencias bibliográficas

- [1] RA Larson, JW Weber: Reaction mechanisms in environmental organic chemistry. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA. (1994).
- [2] Stevenson, F.J. Humus Chemistry Genesis, Composition, Reactions. Wiley Interscience, New York (1982).
- [3] Boyce, S. D., and Hornig, J. F. (1980). Formation of chloroform from the chlorination of diketones and polyhydroxybenzenes in dilute aqueous solution. *Water Chlorination: Environ. Impact Health Eff.*, 3, 131-40.
- [4] S.D. Boyce, J.F. Hornig, Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid. *Environ. Scie. Technol.* 17(1983), 202-11.
- [5] J.J. Rook, Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *Water Treat. Examin.* 23, Pt. 2 (1974) 234-43.
- [6] J.J. Rook, Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of humic acids and resorcinol, *Water Chlorination: Environ. Impact Health Eff.*, 3 (1980) 85-98.
- [7] B. Legube, J.P. Croue, M. Dore, Chlorination of humic substances in aqueous solution: yields of volatile and major non-volatile organic halides. *Scie. Total Environ.* 47 (1985) 217-22.
- [8] D.A. Reckhow, P.C. Singer, R.L. Malcolm, Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations. *Environ. Scie. Technol.* 24(1990) 1655-64.
- [9] X. Yang, C. Shang, Chlorination byproduct formation in the presence of humic acid, model nitrogenous organic compounds, ammonia, and bromide, *Environ. Sci. Technol.* 38(2004), 4995-5001.
- [10] J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems-An Analytical Approach*, Ellis Horwood Limited, England (1990).
- [11] K.W.W. Chin-Chang Hung, P.H. Santschi, A seasonal survey of carbohydrates and uronic acids in the Trinity River, Texas. *Org. Geochem.* 36 (2005) 463-474.
- [12] A. Mannino, H.R. Harvey, Biochemical composition of particles and dissolved organic matter along an estuarine gradient: sources and implications for DOM reactivity (2000).
- [13] P.A. Meyers, *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry* by R. A. Larson and E. J. Weber. *Organic Geochemistry*, 23 (1995), 95.
- [14] A.C. Sigleo, Biochemical composition in suspended particles and colloids: carbohydrates in the Potomac and Patuxent Rivers. *Organic Geochemistry*, 24 (1996) 83-93.
- [15] E.M. Thurman, In: Nijhof, M., Junk, D.W. (Eds.), *Organic Geochemistry of Natural Waters*.
- [16] Costerton, J.W., 1984. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society of Microbiology, Washington, DC, (1985) 115-123
- [17] C.-C. Hung, D. Tang, K. Warnken, P.H. Santschi, Distributions of carbohydrates, including uronic acids, in estuarine waters of Galveston Bay. *Marine Chemistry* 73 (2001) 305-318.
- [18] M.S. Sweet, E.M. Perdue, Concentration and speciation of dissolved sugars in river water, *Environ. Scie. Technol.* 16 (1982), 692-698
- [19] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Characterization of dissolved organic matter from Turia river. Prevalence of low-molecular mass oligosaccharides (submitted for publication).
- [20] R.M. Clark, R.M., B.W. Lykins, DBP control in drinking water: cost and performance, *J. Environmental Engineering* 120 (1994), 759-782
- [21] T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg, R.C. Kroner, Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, *J. Am. Water Works Assoc.* 66 (1974), 703-706.
- [22] T. Nobukawa, S. Sanukida, Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water, *Water Res.* 35 (2001), 4293-4298
- [23] M. Deborde, U.v. Gunten. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment- Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research* 42 (2008), 13-51.
- [24] V.I. Ivanov, L. N. Derevenchuk, V.V. Chupueva, The reaction of chlorine water with carbohydrates, *Russian chemical bulletin*, 11(1962), 166.167.
- [25] K.F. Patel, H.U. Mehta, H.C. Srivastava, H.C., Kinetics and mechanism of oxidation of carbohydrates with chlorine and its derivatives, *Starch* 25 (1973), 266-271.
- [26] F.J. Hallinan, Tests for active residual Cl and chloramine in water. *Journal – American Water Works Association* 36 (1994) 296-302.
- [27] W.J. Cooper, R.G. Zika, M.S. Steinhauer, Bromide-oxidant interactions and THM formation: a literature review. *J. Am. Water Works. Assoc.*, 77 (1985) 116-121.
- [28] S.W. Krasner, M.J. Scilimenti, E.G. Means, Quality degradation: implications for DBP formation. *J. Am. Water Works Assoc.*, 86 (1994) 34-47.
- [29] M. Rebhun, L. Heller-Grossman, J. Manka, D. Kimel, B. Limoni, Trihalomethane formation and distribution in bromide-rich and ammonia-containing lake water, In: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, vol. 6. Lewis, Chelsea, MI. (1990) 665-680.
- [30] J.M. Symons, S.W. Krasner, L.A. Simms, M. Scilimenti, Measurement of THM and precursor concentrations revisited: the effect of bromide ion. *Journal – American Water Works Association* 85 (1993) 51-62.
- [31] J.C. Morris, The chemistry of aqueous chlorine in relation to water chlorination. In: Jolley, R.L. (Ed.), *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, vol. 3. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI (1978).
- [32] F.H. Frimmel, J.B. Jahnel, Formation of haloforms in drinking water. In: Nikolaou, A. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry* (2003).
- [33] J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, mechanisms and structures*, McGraw Hill, New York (1993).

Capítulo 5

**Influencia de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2}
presentes en las aguas duras en la
formación de trihalometanos.**

5.1 Introducción

Los THMs son subproductos no deseables del proceso de desinfección del agua con cloro¹⁻⁵. La concentración de THMs en agua potable está limitada al valor máximo legal de 80 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Estados Unidos y Europa, respectivamente^{6,7}. Cambios en las variables que pueden hacer a un agua natural sobrepasar estos valores son significativos con respecto a este parámetro de calidad del agua. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de formación de THMs a partir de la materia orgánica disuelta en aguas naturales, es un hecho bien establecido el que algunos iones inorgánicos pueden actuar como promotores favoreciendo la formación de THMs^{2,8-10}. Así, como se acaba de comentar en el capítulo anterior, el ión bromuro en concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$ y el ión cloruro en mg L^{-1} ¹¹⁻¹³ aumentan el contenido de THM respecto a disoluciones en las cuales estos aniones están ausentes. En este contexto, se ha sido descrito igualmente que los iones Cu^{+2} pueden catalizar la formación de THMs a partir de ácidos húmicos y el ácido cítrico^{14,15}. Sin embargo, debido a la toxicidad del ión Cu^{+2} ¹⁶ la presencia de este ión metálico en aguas potables a las concentraciones en las que actúa como catalizador de la formación de THMs es poco probable¹⁴. Siguiendo con estos precedentes acerca de la influencia de iones inorgánicos en la formación de THMs, sería de mayor relevancia en los tratamientos de potabilización del agua determinar si la presencia de otros iones metálicos ubicuos en las aguas naturales, y a las concentraciones que típicamente suelen encontrarse, son también precursores de la formación de THMs. Además, también es de interés determinar qué tipo de compuestos orgánicos son más susceptibles de aumentar la formación de THMs cuando están presentes estos iones metálicos.

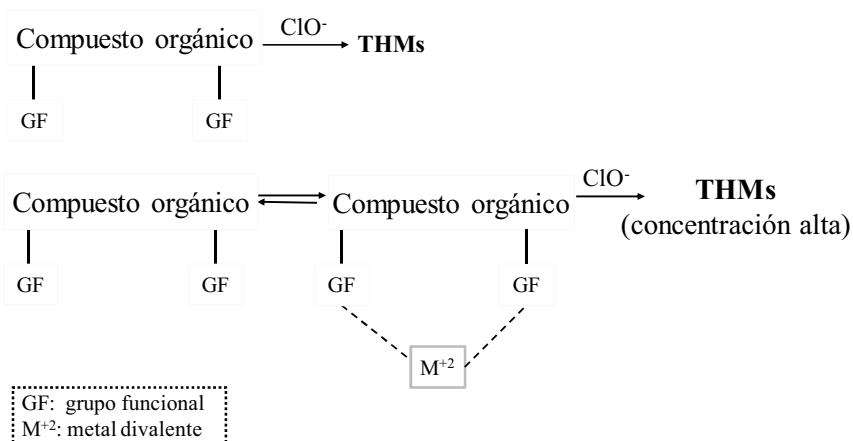
Las aguas duras se caracterizan por una elevada concentración de iones Ca^{+2} y Mg^{+2} . Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha prácticamente han ignorado la posibilidad que estos iones metálicos alcalino térreos puedan influenciar la formación de

THMs. Partiendo del estudio con iones Cu^{+2} , estábamos interesados en determinar si también se observa el mismo efecto de aumento en la concentración de THMs para otro tipo de compuestos orgánicos en disolución y para otros cationes abundantes en las aguas naturales. En particular, queríamos establecer los prerrequisitos estructurales de los compuestos orgánicos para el aumento en la formación de THMs y avanzar en la comprensión del mecanismo a través del cual cationes solvatados catalizan y aceleran la formación de THMs. En el presente capítulo describimos que los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} presentes en aguas duras aumentan la formación de THMs.

En este contexto, es bien conocido que los iones metálicos pueden unirse fuertemente a los grupos carboxilato^{17,18}, estando el complejo en fase acuosa en equilibrio entre el complejo formado entre el carboxilato y el catión metálico con el ión metálico solvatado. Un exceso del ión metálico con respecto al sustrato orgánico favorece la formación del complejo entre el metal y el carboxilato. Una hipótesis de partida del presente capítulo es que la complejación de cationes metálicos con grupos carboxílicos puede provocar el aumento de formación de THMs. Para apoyar esta hipótesis, se ha llevado a cabo un estudio sobre la influencia de la presencia de iones metálicos alcalino térreos en la cantidad de THMs que se generan en disoluciones modelo conteniendo diferentes tipos de compuestos orgánicos que pueden estar presentes en las aguas naturales. Para las disoluciones modelo a estudiar hemos seleccionado algunos compuestos representativos cuya presencia ha sido descrita en las aguas naturales. En toda la serie de experimentos la concentración total de carbono orgánico disuelto (COD) de los compuestos modelo se fijó a 2 mg L^{-1} . Algunos valores comunes de COD en las aguas naturales varían entre $1\text{-}4 \text{ mg L}^{-1}$ ^{19,20}. Hemos comparado su actividad catalítica para la formación de THMs de los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} con la del ión Cu^{+2} ¹⁴. Por otro lado, el rango de concentraciones empleado es común entre las encontradas en el tratamiento de aguas²¹ donde la cloración tiene lugar en aguas de abastecimiento que contienen Mg^{+2} y Ca^{+2} . Se espera que el exceso de los iones metálicos Mg^{+2} y Ca^{+2} favorezca que la mayor parte de los sustratos orgánicos se encuentren complejados por el ión metálico y por lo tanto la formación de estos complejos metálicos pueda cambiar su reactividad de la materia orgánica frente al cloro.

5.2 Influencia del Ca^{+2} y Mg^{+2} en la formación de THMs

De acuerdo con el objetivo de este Capítulo centrado en el estudio de la influencia de iones metálicos divalentes en la formación de THMs a partir de la materia orgánica disuelta, se han preparado disoluciones patrón conteniendo ácidos húmicos y ácido cítrico así como polioles incluyendo monosacáridos y ácidos dicarboxílicos de diferente longitud de cadena. El propósito es determinar si la presencia de Mg^{+2} y Ca^{+2} produce un aumento en la formación de THMs tanto en disoluciones que contienen ácidos húmicos como en aquellas que poseen compuestos más simples como polioles y en ácidos dicarboxílicos simples. Es conocido que moléculas conteniendo dos o más grupos hidroxilo pueden complejar a iones metálicos actuando como ligandos polidentados ²². La constante de complejación de iones metálicos con ligandos polidentados es generalmente más elevada y ello podría reflejarse en un incremento en la formación de THMs. El esquema 5.1 ilustra la hipótesis de partida de cómo la formación de THMs puede verse favorecida por el complejamiento con iones metálicos actuando como ácidos de Lewis así como la necesidad de grupos funcionales disponibles en el sustrato para interactuar con los iones metálicos.



Esquema 5.1. Hipótesis de partida en base a la cual los iones metálicos podrían influir en la formación de THM.

Considerando los precedentes comentados anteriormente, llevamos a cabo un estudio sobre la formación de THMs en disoluciones modelo de ácidos húmicos y ácido cítrico en ausencia y en presencia de Cu^{+2} (1 mg L^{-1}). La concentración de ácidos húmicos y ácido cítrico fue de 2 mg L^{-1} de COD la cual es similar a la empleada en trabajos previos ¹⁴ y no está lejos del COD encontrado en aguas naturales ^{19,20}. En estudios preliminares se reprodujeron los resultados descritos ¹⁴ además de observar igualmente un aumento en la

formación de THMs debido a la presencia de Cu^{+2} en compuestos polihidroxílicos y policarboxílicos los cuales no habían sido estudiados con anterioridad (ver Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Concentraciones de CHCl_3 formadas por cloración de los compuestos modelo en presencia de iones metálicos. Condiciones de ensayo: 2 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} de cloro libre, pH 7.8, 20 °C, tiempo de reacción 72 h. Los datos de la Tabla corresponden al valor medio de tres experimentos independientes de cloración. El error relativo estimado de THM es de $\pm 2\%$.

Sustrato orgánico	CHCl_3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Aumento de CHCl_3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
		$[\text{Ca}^{2+}]$, (mg L^{-1})		$[\text{Mg}^{2+}]$ (mg L^{-1})		$[\text{Cu}^{2+}]$ (mg L^{-1})
		60	100	30	60	1
Glideraldehído	106,0	10,6	20,2	11,7	23,3	9,5
Fructosa	88,0	5,3	7,1	7,0	7,9	13,2
Maltosa	107,0	8,6	19,3	13,9	32,1	10,7
Maltotriosa	122,0	4,9	15,9	18,3	26,8	13,4
Maltopentosa	125,0	7,5	16,3	17,5	40,0	12,5
Histidina	28,0	0,3	0,3	0,3	0,8	5,3
Ácido propanodioico	4,0	0,0	0,12	0,2	0,4	0,4
Ácido fumárico	7,0	0,5	0,9	0,6	0,9	0,9
Ácido maleico	6,0	0,4	0,6	0,4	0,7	0,5
Ácido glutárico	9,0	0,5	1,8	1,4	2,1	1,4
Ácido adípico	18,0	0,2	0,5	0,9	2,5	2,9
Ácido cítrico	52,0	13,5	21,3	28,6	45,2	38,5
Ácidos húmicos	160,0	47,5	52,7	49,6	54,4	48,0
Resorcinol	1.650,0	15,0	31,0	16,5	33,0	66,0

De acuerdo con nuestro plan de trabajo, procedimos a determinar la cantidad de THMs formados a partir de disoluciones modelo conteniendo varias concentraciones de Mg^{+2} y Ca^{+2} . Estos dos metales alcalino térreos están presentes en altas concentraciones, particularmente en aguas naturales duras ²¹. Así pues, hemos estudiado dos concentraciones en el rango típicamente encontrado en aguas duras (Ca^{+2} 60 y 100 mg L^{-1} ;

Mg^{+2} 30 y 60 mg L^{-1})²¹. Con las concentraciones de Mg^{+2} y Ca^{+2} empleadas y trabajando con disoluciones tamponadas con HCO_3^- (pH 7.8), las sales de nitrato de estos cationes fueron totalmente solubles sin afectar al valor de pH. Los resultados obtenidos indican que estos iones metálicos alcalino térreos son efectivos en muchos casos aumentando la formación de THMs. Tal y como se muestra en la Tabla 5.1, la presencia de Mg^{+2} y Ca^{+2} aumenta la formación de THMs en polioles, en el caso del ácido cítrico y en los casos de los ácidos húmicos. Por el contrario la presencia de los iones Mg^{+2} ó Ca^{+2} no influyen en los THMs que se generan a partir de histidina y ácidos dicarboxílicos. En el caso de los polioles la presencia de Cu^{+2} en concentración de 1 mg L^{-1} produce un aumento de THMs menor que los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} en concentraciones comunes en aguas duras. Obviamente, si se emplean cantidades menores de Mg^{+2} o Ca^{+2} la influencia de su presencia en la formación de THM es significativamente menor y frecuentemente insignificante.

En el caso del resorcinol, su reactividad frente al cloro es tan elevada que la influencia de la presencia o ausencia de iones metálicos es marginal. Vale la pena comentar los casos de la maltosa y la maltopentosa para los cuales cuando están presentes 60 mg L^{-1} de Mg^{+2} , tiene lugar un incremento de CHCl_3 de 32,1 y 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Particularmente relevante debido a su presencia ubicua en las aguas naturales es determinar si los iones metálicos alcalino térreos Mg^{+2} y Ca^{+2} promueven la formación de THMs a partir de los ácidos húmicos y del ácido cítrico en concentraciones posibles en aguas naturales. Conviene recordar que la formación de THMs es un proceso que ocurre en el rango de $\mu\text{g L}^{-1}$, y que la cantidad total de sustrato orgánico convertido depende de su estructura química pero suele ser muy baja. Por ejemplo, en capítulos anteriores hemos establecido que cuando los sustratos iniciales son carbohidratos el porcentaje del carbono inicial convertido está muy por debajo del 1%^{10,13}.

Con respecto a la influencia de la concentración de los cationes alcalino térreos en la formación de THMs se observó generalmente un aumento con la concentración del ión metálico. Sin embargo, este aumento depende de la naturaleza del sustrato y, así, es casi lineal en muchos casos pero en otros mayor (caso de la maltopentosa) ó menor (caso de la fructosa e histidina).

Los datos mostrados en la Tabla 5.1 se refieren a la formación de THMs a las 72 h. En el contexto de determinar la influencia de la dureza en la evolución de los THMs también es de interés seguir la evolución temporal de la formación de THMs para establecer que el contenido de THMs en aguas duras es mayor a cualquier tiempo que el contenido de THMs en ausencia de las sales de Ca^{+2} y Mg^{+2} . Las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3 muestran la evolución

temporal de THM en ausencia o en presencia de varias concentraciones de Mg^{+2} y Ca^{+2} para una serie de sustratos. Tal y como se puede ver en estas figuras, para cada uno de estos compuestos y a cualquier tiempo la concentración de THMs es mayor cuando están presentes los iones Ca^{+2} o Mg^{+2} y generalmente aumenta con la concentración del ión metálico alcalino térreo. Las curvas presentadas en estas figuras establecen firmemente que, tal y como ha sido demostrado previamente para el Cu^{+2} , los iones metálicos alcalino térreos también pueden promover la formación de THMs. En algunos casos, como los carbohidratos y el ácido cítrico principalmente en presencia de Mg^{+2} , el efecto es notable, y casi puede llegar a duplicar la cantidad de THMs que se forman en ausencia de iones alcalino térreos.

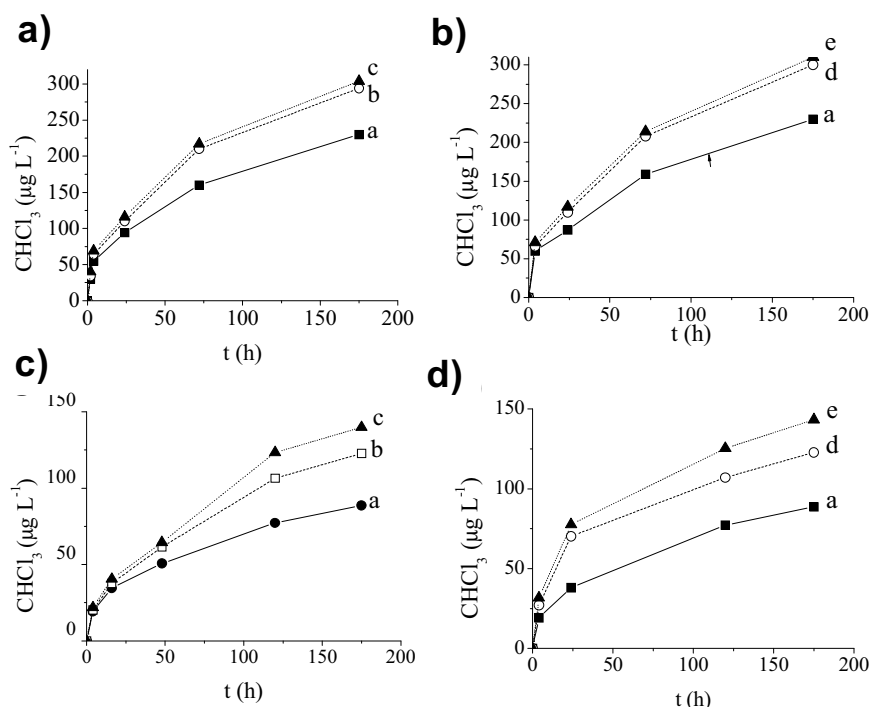


Figura 5.1. Evolución temporal de formación de CHCl_3 para los ácidos húmicos (a, b) y el ácido cítrico (c, d) en ausencia (a) y presencia de Ca^{+2} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}) y Mg^{+2} (d: 30 mg L^{-1} , e: 60 mg L^{-1}). Las condiciones de reacción se indican en la sección experimental. El error estimado de los puntos experimentales es $\pm 2\%$.

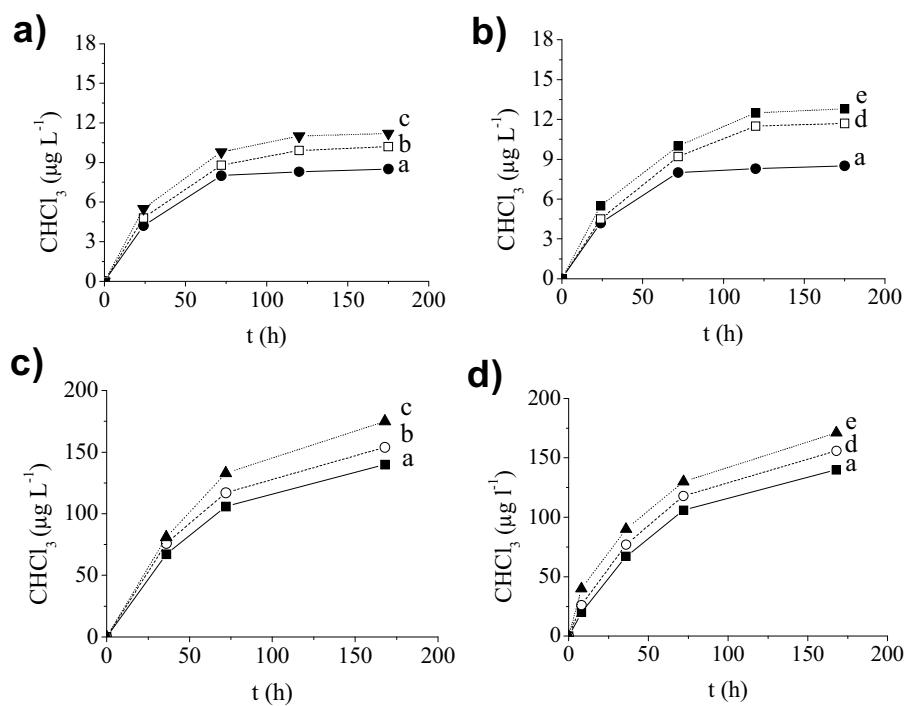


Figura 5.2. Evolución temporal de formación de CHCl_3 para el ácido glutámico (a, b) y el gliceraldehído (c, d) en ausencia (a) y presencia de Ca^{+2} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}) y Mg^{+2} (d: 30 mg L^{-1} , e: 60 mg L^{-1}). Las condiciones de reacción se indican en la sección experimental. El error estimado de los puntos experimentales es $\pm 2\%$.

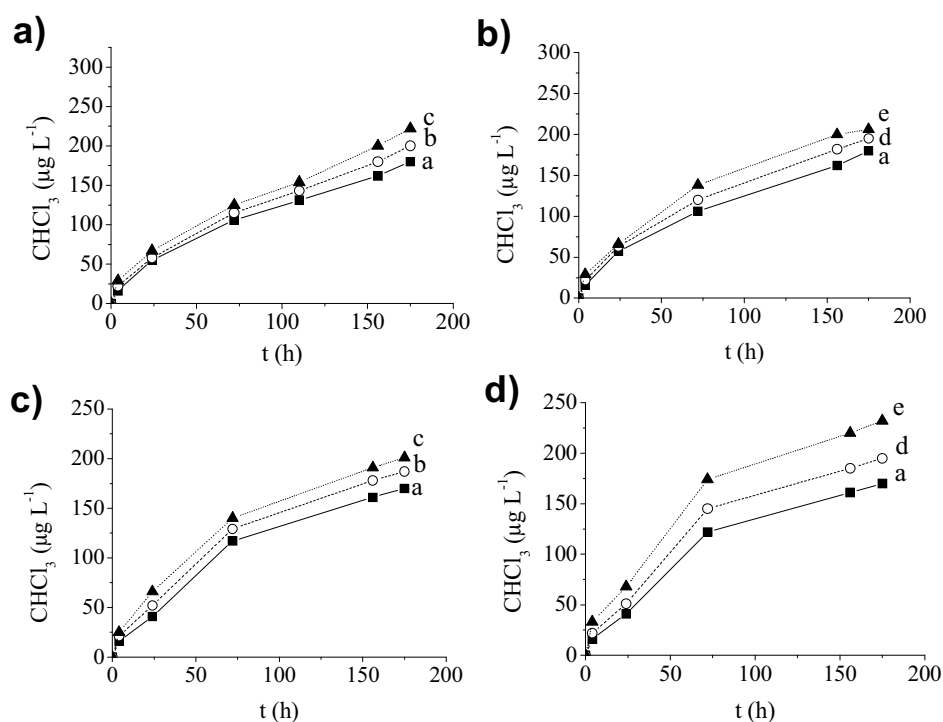
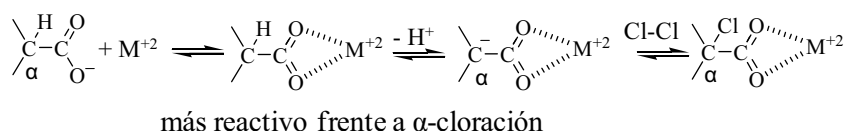


Figura 5.3. Evolución temporal de formación de CHCl_3 para la maltosa (a, b) y la maltotriosa (c, d) en ausencia (a) y presencia de Ca^{+2} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}) y Mg^{+2} (d: 30 mg L^{-1} , e: 60 mg L^{-1}). Las condiciones de reacción se indican en la sección experimental. El error estimado de los puntos experimentales es $\pm 2\%$.

Un punto de interés es comparar la actividad de aumento de THMs de los tres cationes bajo estudio. A partir de la mayor actividad del Cu^{+2} y su influencia general en todos los compuestos ensayados (incluyendo la histidina), puede concluirse que este catión es el más eficiente de la serie por lo que respecta a la actividad para promover la formación de THMs. El segundo en eficiencia es Mg^{+2} . Este orden de actividad ($\text{Cu}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$) debe ser una consecuencia del mecanismo de acción en el aumento de THMs. La formación de THMs es un mecanismo complejo que depende del sustrato. Rook y Boyce estudiaron en detalle el mecanismo de formación de THMs a partir de resorcinol y β -dicetonas^{4,23,24}. En ambos casos, el mecanismo propuesto para la formación de THMs implica más de diez pasos individuales. También en el caso del ácido cítrico, el mecanismo de formación de THMs ha sido estudiado con algún detalle y se ha propuesto que ocurre a través de una descarboxilación inicial seguida de la cloración del intermedio ácido 3-

oxopentanoico ²⁵. Para los otros sustratos bajo estudio (carbohidratos, ácidos policarboxílicos, ácidos húmicos y histidina) no hay en la literatura estudios mecanísticos encaminados a establecer en detalle las múltiples etapas que conducen a la formación de THMs. Así pues, la complejidad de la formación de THMs con múltiples y consecutivos pasos hace difícil proponer cómo los cationes metálicos intervienen en el proceso. Sin embargo, sugerimos que el paso crucial en el mecanismo de acción de los iones metálicos disueltos implica una complejación inicial del ión metálico con el sustrato antes de su reacción con el cloro. En este caso la fuerza de la acidez de Lewis del ión metálico sería el factor clave para el aumento en la formación de THMs. El esquema 5.2 ilustra que los iones metálicos pueden unirse a los grupos carboxilato de los sustratos y mediante la formación de un complejo metal-ligando aumentaría la reactividad de los sustratos hacia la cloración. La acidez de Lewis de los cationes debería seguir el orden de densidad de carga de estos iones. Por esta razón considerando la relación de carga con el radio iónico (Cu^{+2} , 0,73 Å, Mg^{+2} 0,72 Å, Ca^{+2} 0,99 Å) el catión menos ácido (Ca^{+2}) debería ser también el menos activo.



Esquema 5.2. Propuesta para racionalizar la influencia de la acidez de Lewis en la cloración de ácidos carboxílicos.

Respecto a la eficiencia relativa de los iones metálicos de Cu^{+2} y Mg^{+2} , las diferencias mínimas esperables en su fuerza ácida no pueden racionalizar su diferencia en la actividad para el aumento de THMs puesto que ambos cationes tienen la misma densidad de carga. Para justificar la mayor eficiencia de los iones Cu^{+2} hay que admitir que, otros factores a parte de la acidez también deben jugar un papel. Además de la acidez de Lewis, el ión Cu^{+2} también puede ser activo como centro redox debido a la existencia dos estados de oxidación para el cobre. De esta manera, el ión Cu^{+2} puede promover etapas elementales que implican procesos redox además de promover adiciones nucleofílicas. Debido a que el cloro puede actuar como agente electrófilo y oxidante, proponemos que estos dos tipos de procesos pueden ser catalizados por el ión Cu^{+2} pero no por los iones Mg^{+2} o Ca^{+2} . Estas dos propiedades de los iones Cu^{+2} como catalizador redox y ácido de Lewis explicarían su mayor actividad.

A pesar de la menor actividad del Ca^{+2} para promover la formación de THMs debe tenerse en cuenta que su mayor concentración en aguas naturales puede compensar esta menor actividad. Así pues, tal y como se comentó en la introducción, aguas que contengan 1 mg L^{-1} de Cu^{+2} son inusuales ²⁶, mientras que es muy común que aguas duras contengan hasta 150 mg L^{-1} de Ca^{+2} ²¹. Además el límite legal de Cu^{+2} para aguas potables es de 2 mg L^{-1} ⁶, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluso recomienda la presencia de calcio en agua potable por razones dietéticas ²⁷.

El estudio anterior se llevó a cabo con disoluciones modelos que fueron preparadas con compuestos puros. En este contexto, también es de interés demostrar que un aumento similar en la formación de THMs ocurre cuando aguas naturales se someten a cloración en presencia de cantidades crecientes de los iones metálicos alcalino térreos. A fin de abordar este punto, tomamos muestras de agua del río Turia en el punto en que se encuentra la planta potabilizadora de La Presa (Ribarroja del Turia) y procedimos a llevar a cabo estudios análogos sobre la influencia de Mg^{+2} y Ca^{+2} en la formación de THM en esta agua natural. En este punto debe tenerse en cuenta que el agua de abastecimiento consiste en una mezcla compleja de materia orgánica disuelta ²⁸⁻³⁰ y que el agua ya contiene una concentración de 145 y 37 mg L^{-1} de Ca^{+2} y Mg^{+2} , respectivamente. Medimos la evolución de formación de THMs de esta agua natural y la comparamos con la evolución de THMs del mismo agua cuando fueron añadidas cantidades adicionales de Mg^{+2} y Ca^{+2} . Los resultados se muestran en la Figura 5.4.

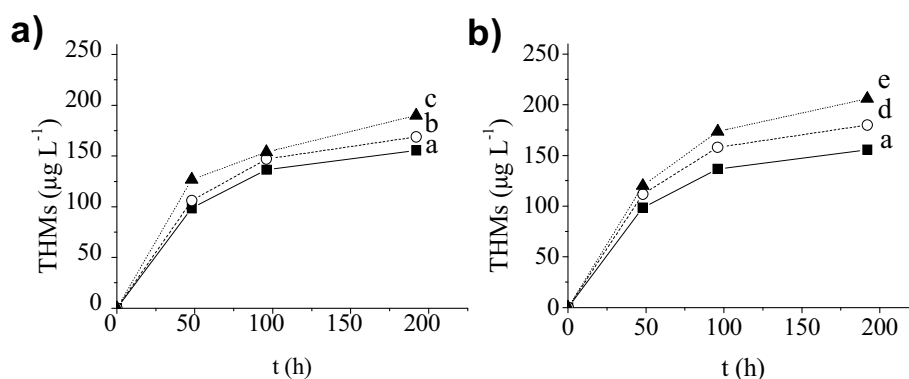


Figura 5.4. Evolución temporal de la formación de THMs en el agua del río Turia (a, b) sin adición (a) y con adición de Ca^{+2} (b: 60 mg L^{-1} ; c: 100 mg L^{-1}) y Mg^{+2} (b: 30 mg L^{-1} ; c: 60 mg L^{-1}). Condiciones de reacción: 1.8 mg L^{-1} COD, 10 mg L^{-1} cloro libre, pH 7.8, $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Nótese que el agua natural ya contiene Ca^{+2} and Mg^{+2} (ver el texto). El error estimado de los puntos experimentales es de $\pm 2\%$.

En comparación con el comportamiento de las disoluciones modelo mostradas en las Figuras 5.1-5.3 en donde el único THM formado fue el CHCl_3 (ver eje vertical de las Figuras 5.1-5.3) en el caso del agua natural la presencia de bromuro en la composición (ver sección experimental) provoca la formación de THMs bromados. Los datos presentados en la Figura 5.4 corresponden a la cantidad total de THMs. El aumento de THMs, a tiempo final (8 días), cuando se añaden 60 y 100 mg L^{-1} de Ca^{+2} adicionales es de 13,9 y 34 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Si se añade al agua natural 30 y 60 mg L^{-1} de Mg^{+2} el aumento de THMs, a tiempo final (8 días) es de 24,7 y 50,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. El incremento de cada THM individual (ver Tabla 5.2) en $\mu\text{g L}^{-1}$, en las condiciones de mayor incremento fue de hasta 22 en el caso del CHCl_3 , 21 para el CHBrCl_2 , 7 para el CHClBr_2 y 3 para el CHBr_3 . Tal y como puede observarse aunque todos los THMs se ven afectados por la presencia de los iones metálicos alcalino térreos, el CHCl_3 y el CHBrCl_2 están influenciados en mayor medida. Por tanto, los resultados anteriores muestran que también para aguas naturales la presencia de concentraciones adicionales de Mg^{+2} y Ca^{+2} produce un aumento en la formación de THMs. Además, este aumento se correlaciona con la concentración adicional de Mg^{+2} y Ca^{+2} . En otras palabras, también para aguas naturales tiene lugar el efecto que hemos observado para disoluciones modelo; ocurriendo un aumento en la formación de THMs para aguas naturales cuando a ésta se añade iones Mg^{+2} y Ca^{+2} .

Tabla 5.2. Datos individuales de THMs a diferentes tiempos después de la cloración de una muestra del río Turia con y sin adición de Ca^{+2} o Mg^{+2} .

t (h)	CHCl_3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
		60 mg L^{-1} Ca^{+2}	100 mg L^{-1} Ca^{+2}	30 mg L^{-1} Mg^{+2}	60 mg L^{-1} Mg^{+2}
0	0	0	0	0	0
42,0	30,3	32,3	54,1	39,0	42,1
96,0	39,8	45,2	56,1	46,1	55,3
192,0	44,1	50,3	66,0	54,1	66,1
t (h)	CHBrCl_2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
		60 mg L^{-1} Ca^{+2}	100 mg L^{-1} Ca^{+2}	30 mg L^{-1} Mg^{+2}	60 mg L^{-1} Mg^{+2}
0	0	0	0	0	0
42,0	37,2	41,7	47,0	39,2	43,7
96,0	54,7	58,2	63,3	64,5	66,4
192,0	60,4	65,3	78,2	69,3	81,1

Tabla 5.2 (Continuación)

t (h)		CHClBr ₂ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		60 mg L ⁻¹ Ca ⁺²	100 mg L ⁻¹ Ca ⁺²	30 mg L ⁻¹ Mg ⁺²	60 mg L ⁻¹ Mg ⁺²
0	0	0	0	0	0
42,0	27,0	27,9	21,6	28,8	30,2
96,0	34,2	36,1	25,5	39,3	43,1
192,0	39,0	41,2	32,5	44,1	46,1
t (h)		CHBr ₃ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
		60 mg L ⁻¹ Ca ⁺²	100 mg L ⁻¹ Ca ⁺²	30 mg L ⁻¹ Mg ⁺²	60 mg L ⁻¹ Mg ⁺²
0	0	0	0	0	0
42,0	4,0	4,1	4,1	4,1	4,1
96,0	8,0	8,2	8,3	8,2	8,3
192,0	12,0	12,6	12,5	12,7	12,9

5.3 Conclusiones

En resumen, en el presente capítulo se han presentado datos que muestran que el Mg^{+2} y el Ca^{+2} , dos iones metálicos alcalino térreos ubicuos, en las concentraciones que pueden ser encontradas en aguas duras pueden actuar como promotores en la formación de THMs. La promoción de THMs por los iones metálicos disueltos sigue el orden $\text{Cu}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$. La menor actividad del Ca^{+2} puede ser compensada por su mayor abundancia natural. Empleando disoluciones modelo, hemos mostrado que el efecto de Mg^{+2} y Ca^{+2} aumentando la formación de THMs depende en gran medida de la estructura química del sustrato, siendo los polioles, el ácido cítrico y los ácidos húmicos los que están particularmente influenciados. Por el contrario la formación de THMs no se ve alterada prácticamente por Mg^{+2} y Ca^{+2} en los casos de la histidina, el resorcinol y de los ácidos dicarboxílicos. Nuestros resultados son relevantes en el contexto de la calidad del agua potable y muestra que aguas duras conteniendo Mg^{+2} y Ca^{+2} son más susceptibles de producir mayores valores de THMs que las blandas conteniendo compuestos orgánicos análogos.

5.4 Referencias bibliográficas

- [1] L. Attias, A. Contu, A. Loizzo, M. Massiglia, P. Valente, G.A. Zapponi, Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans, *Sci. Total Environ.* 171 (1995) 61-68
- [2] T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg, R.C. Kroner, R.C., Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, *J. Am. Water Works Assoc.* 66(1974), 703-706.
- [3] J.J. Rook, Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *Water Treat. Examin.*, 23 (1974) 234-243
- [4] J.J. Rook, Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of ácidos húmicos and resorcinol.. In: Jolley, R.L., Brungs, W.A., Cumming, R.B. (Eds.). *Water Chlorination: Environmental Impact Health Effects.* Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, Vol 3 (1980) 85-98.
- [5] United States Environmental Protection Agency, Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Washington DC., USA, EPA/630/P-03/001 (2005).
- [6] European Union, Council Directive 98 / 83 / EC of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Communities L 330 (1998)* 32-54.
- [7] United States Environmental Protection Agency, National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products, final rule, Washington, DC., USA, (1998) 69390-69476.
- [8] W.J. Cooper, R.G. Zika, M.S. Steinhauer, Bromide-oxidant interactions and THM formation: a literature review. *J. Am. Water Works Assoc.* 77(1985) 116-121.
- [9] S.W. Krasner, M.J. Scilimenti, E.G. Means, Quality degradation: implications for DBP formation. *J. Am. Water Works Assoc.* 86(1994), 34-47.
- [10] M. Deborde, U.V. Gunten, Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment- Kinetics and mechanisms: a critical review, *Water Res.* 42 (2008) 13-51
- [11] J.M. Symons, S.W. Krasner, M.J. Scilimenti, L.A. Simms, H.W.J. Sorensen, G.E.J. Speitel, A.C. Diehl, Influence of bromide ion on trihalomethane and haloacetic acid formation, In: Minear, R.A., Amy, G.L., (Eds.). *Disinfection by-products in water treatment, The Chemistry of Their Formation and Control.* CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, (1996) 91-130.
- [12] T. Nobukawa, S. Sanukida, Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water, *Water Res.* 35 (2001) 4293-4298.
- [13] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl- and Br- on trihalomethane formation potential, *Water Res.* 42 (2008) 3990-4000.
- [14] E.R. Blatchley, D. Margetasb, R. Duggirala, R., Copper catalysis in chloroform formation during water chlorination, *Water Res.* 37 (2003) 4385-4394.
- [15] J.Q. Bo Li, L. Huijuan, C. Hu, Effects of copper(II) and copper oxides on THMs formation in copper pipe. *Chemosphere* 68 (2007) 2153-2160.
- [16] V.P. Utgikar, Chaudhary, A. Koenigerc, H.H. Tabak, J.R. Haines, R. Govind, Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper, *Water Res.* 38 (2004) 3651-3658.
- [17] T. Dudev, C. Lim, Effect of Carboxylate-Binding Mode on Metal Binding/Selectivity and Function in Proteins. *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 85-93.
- [18] P.G. Daniele, C. Foti, A. Gianguzza, E. Prenesti, S. Sammartano, Weak alkali and alkaline earth metal complexes of low molecular weight ligands in aqueous solution, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 1093-1107
- [19] G.R. Aiken, A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances, in: F.H. Frimmel, R.F. Christman (Eds.), *Humic Substances and their Role in the Environment*, Wiley Environment, Wiley, New York, 1988, pp. 15-30.
- [20] J.M. Symons, R. Xia, A.C. Diehl, G.E. Speitel Jr., C.J. Hwang, S.W. Krasner, S.E. Barrett, The influence of operational variables on the formation of dissolved organic halogen during chloramination, in: R.A. Minear, G.L. Amy (Eds.), *Water Disinfection and Natural Organic Matter: Characterization and Control*, ACS Symposium Series 649, American Chemical Society, Washington, DC, (1996) 78-104.
- [21] World Health Organization, Guidelines for Drinking-water Quality. 4th edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2008).
- [22] B. Gyurcsik, L. Nagy, Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes, *Coordin. Chem. Rev.* 203 (2000) 81-149.
- [23] S.D. Boyce, J.F. Hornig, Formation of chloroform from the chlorination of diketones and polyhydroxybenzenes in dilute aqueous solution, in: R.L. Jolley, W.A. Brungs, R.B. Cumming (Eds.), *Water Chlorination: Environmental Impact Health Effects*, vol. 3, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, (1980) 131-140.
- [24] S.D. Boyce, J.F. Hornig, Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid, *Environ. Sci. Technol.* 17 (1983) 202-211
- [25] R.A. Larson, A.L. Rockwell, Chloroform and chlorophenol production by decarboxylation of natural acids during aqueous chlorination, *Environ. Sci. Technol.* 13 (1979) 325-329.
- [26] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for copper, <http://www.eco-usa.net/toxics/copper.shtml> (1990).
- [27] World Health Organization, Nutrient minerals in drinking-water and the potential health consequences of long-term consumption of demineralized and remineralized and altered mineral content drinking-waters, Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2004).

- [28] J. Buffle, F.L. Greter, W. Haerdi, Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* 49 (1977) 216-222.
- [29] M. Schnitzer, S.U. Khan, *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker, New York, USA, (1972).
- [30] F.J. Stevenson, *Humus chemistry genesis, composition, reactions*, Wiley Interscience, New York, USA (1982).
- [31] US EPA, Method 524.2: Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry, US EPA, Cincinnati, OH, 1995

Capítulo 6

Reacción del dióxido de cloro con antibióticos como contaminantes emergentes en aguas. Estudio de reacción de tres antibióticos β -lactámicos.

6.1 Introducción

Hay una preocupación creciente por la presencia en los recursos acuáticos de compuestos farmacéuticos con actividad biológica debido a los efectos adversos que estos compuestos pueden causar en la salud humana como consecuencia de una ingestión continuada¹⁻³. Se ha demostrado que el tratamiento realizado en las depuradoras de aguas residuales no produce una eliminación completa de la mayoría de las sustancias terapéuticas más empleadas⁴⁻⁸. Análisis de control han establecido la presencia de medicamentos y sus metabolitos aguas abajo de las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales. Además, la detección ocasional de sustancias terapéuticas en aguas subterráneas es igualmente un motivo de preocupación.

El dióxido de cloro (ClO₂) es uno de los agentes desinfectantes empleados como alternativa al uso de cloro en el proceso de potabilización de aguas⁹⁻¹². Una de las mayores ventajas del ClO₂ con respecto al cloro es que no da lugar a la formación de trihalometanos (THMs)^{13,14}. Como se ha venido comentando, reglamentaciones europeas¹⁵ han introducido recientemente un límite máximo en el contenido de THMs en las aguas potables y con objeto de minimizar su formación hay una tendencia general en todo el mundo a reducir el uso de cloro en las plantas potabilizadoras promoviendo el empleo de agentes desinfectantes alternativos.

Teniendo en cuenta el aumento previsible en el uso del ClO₂ en la potabilización de aguas, es de interés determinar la reactividad de este agente desinfectante frente a compuestos orgánicos que pueden estar presentes en los recursos acuáticos¹⁶. Más concretamente, es de interés determinar los productos de reacción del ClO₂ con compuestos farmacéuticos de gran consumo y que han sido detectados en aguas superficiales y subterráneas, puesto que algunos de estos productos pueden tener efectos biológicos adversos. Particularmente, sería relevante determinar las consecuencias de la ingesta crónica de pequeñas dosis de productos derivados de la reacción del ClO₂ con algunas de las sustancias farmacéuticas más comunes.

En el presente Capítulo se describe la reactividad en condiciones que pueden ser de cierta relevancia en la potabilización de aguas del ClO₂ con tres de los antibióticos β-lactámicos más vendidos. En particular, hemos llevado a cabo el estudio de la estequiometría de la reacción entre estos antibióticos y el ClO₂ para determinar si el ClO₂ en condiciones aerobias puede o no descomponer catalíticamente este tipo de antibióticos. También hemos procedido a caracterizar los productos de reacción del ClO₂ con estos antibióticos y a determinar el efecto que el tratamiento previo con ClO₂ tiene sobre la posterior formación de trihalometanos en la etapa de cloración.

Nuestros resultados demuestran que el ClO₂ lleva a cabo la degradación de estos antibióticos de modo estequiométrico, transformándolos en productos derivados y reduciendo en algunos casos el contenido de THMs que se forman en la etapa de cloración.

6.2 Reacción de antibióticos β-lactámicos con ClO₂

Los antibióticos seleccionados para el presente estudio han sido penicilina (PEN), amoxicilina (AMO) y cefadroxil (CEF) que son tres de los antibióticos más ampliamente utilizados y cuya presencia ha sido detectada en aguas urbanas depuradas. Las estructuras de estos antibióticos se muestran en la Figura 6.1.

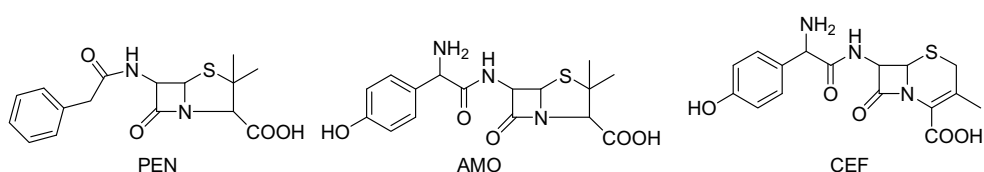


Figura 6.1 Estructura química de los antibióticos objeto de estudio.

A continuación se describen por separado los resultados obtenidos en cada uno de los casos.

6.2.1 Reacción del ClO₂ con penicilina

A pH 7 la penicilina G (PEN) reacciona muy lentamente con el ClO₂. La reactividad del ClO₂ frente a PEN disminuye aún más cuando el pH aumenta a 9 unidades. En contraste con la práctica ausencia de reactividad a pH neutro o básico, el ClO₂ es capaz de reaccionar con PEN a valores de pH ácidos. Hemos estudiado la reactividad en el rango de pH comprendido entre 3,5 y 6,4 unidades. La tendencia observada es que la velocidad de reacción y el porcentaje de desaparición de PEN aumentan progresivamente conforme disminuyen los valores de pH. La Figura 6.2 (a) muestra el porcentaje de desaparición de PEN a las 2 h frente a la concentración de ClO₂ añadida cuando la reacción tiene lugar a pH 3,5.

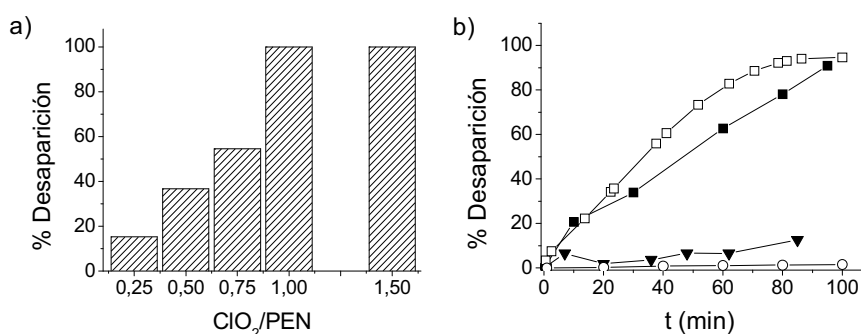


Figura 6.2. Porcentaje de desaparición de PEN pH = 3,5 después de 2 h de reacción en función de la relación molar ClO₂/PEN (a). Gráfico de conversión temporal para la reacción de PEN con un equivalente de ClO₂ a pH 3,5 (b). ▼ Desaparición de PEN en ausencia de ClO₂, ■ Desaparición de PEN por reacción con ClO₂, □ Consumo de ClO₂ en presencia de PEN ○ Desaparición de ClO₂ en ausencia de PEN.

Tal y como puede verse en la Figura 6.2a, la reacción a este pH ácido parece exhibir una estequiometría 1:1, aumentando proporcionalmente el porcentaje de desaparición de PEN a las 2 horas de reacción con la dosis de ClO₂. También estudiamos las cinéticas de reacción de PEN con ClO₂ a otros tres pHs diferentes en el rango de 3.5 - 6.4 determinando la conversión y el consumo de ClO₂ en función del tiempo. Las Figuras 6.2 (b) y 6.3 muestran la desaparición de la concentración de ClO₂ y de PEN frente al tiempo en función del valor de pH de la disolución.

En estas gráficas también se han incluido los resultados de dos experimentos de control consistentes en la desaparición espontánea de ClO₂ en ausencia de PEN y de desaparición de PEN en ausencia de ClO₂ a los correspondientes valores de pH. Estos blancos de control muestran que PEN descompone espontáneamente alrededor de un 10% en ausencia de ClO₂ en este rango de pH. De manera análoga, el ClO₂ es estable en este rango de pH para el intervalo de tiempo de la reacción con PEN. En contraste con estos blancos de control, la reacción de PEN con ClO₂, caracterizada por la velocidad inicial de reacción y el porcentaje de desaparición a los 60 min de reacción, mostró una fuerte dependencia del pH. La máxima velocidad inicial de reacción y el porcentaje de desaparición de PEN a los 100 min se alcanza con los valores de pH más bajos, mientras que a mayores valores de pH está claro que el decaimiento de la concentración de ClO₂ no está asociado con un incremento proporcional en el porcentaje de desaparición de PEN. A estos valores de pH mayores que 5 el ClO₂ desaparece en un alto porcentaje en presencia de la β -lactama mientras que la concentración de PEN permanece inalterada. Considerando que las pruebas control indican que el ClO₂ en ausencia de PEN no descompone

espontáneamente a esos valores de pH cabe concluir que, particularmente a pH 6,4, la β -lactama está jugando el papel de organocatalizador promoviendo la descomposición del ClO₂ sin consumirse él mismo en la misma medida.

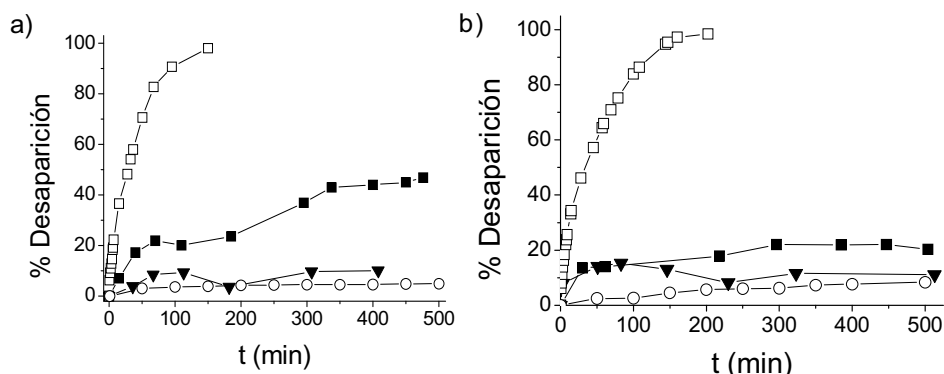
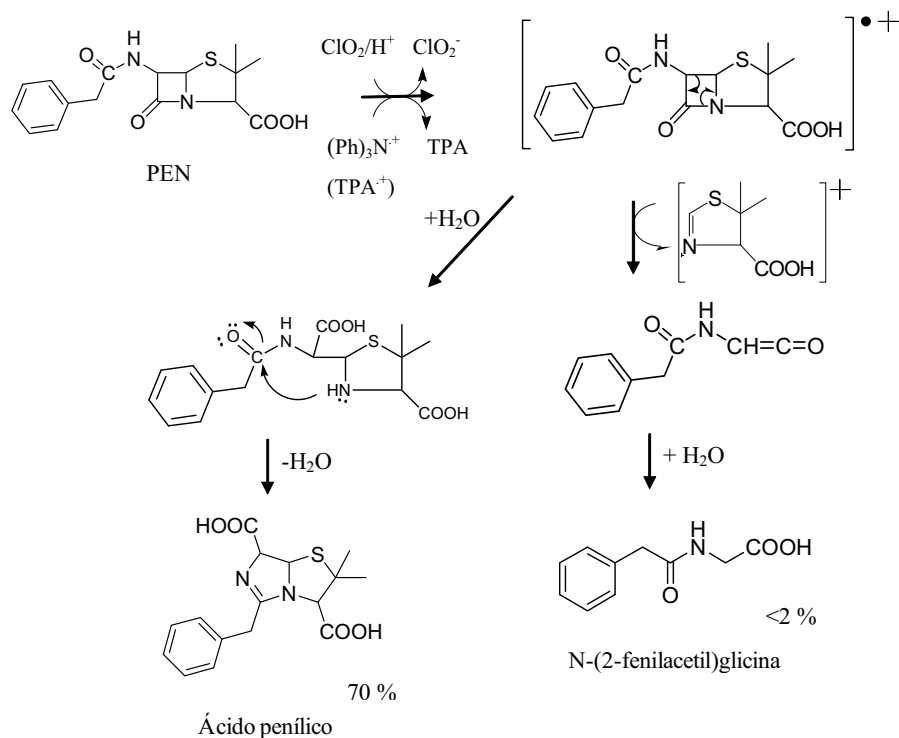


Figura 6.3. Gráfica de conversión temporal para la reacción de PEN con un equivalente de ClO₂ a pH 5,4 (a) y a pH 6,4 (b). ▼ Desaparición de PEN en ausencia de ClO₂, ■ Desaparición de PEN por reacción con ClO₂, □ Consumo de ClO₂ en presencia de PEN, ○ Desaparición de ClO₂ en ausencia de PEN.

Los productos formados por reacción de PEN con ClO₂ se caracterizaron por medio de técnicas espectroscópicas incluyendo RMN-¹H Y RMN-¹³C, y HPLC-MS. Los datos indican que el producto predominante es el ácido penílico acompañado de pequeñas cantidades de N-(2-fenilacetil)glicina (Esquema 6.1). Cabe señalar que el ácido penílico (aunque en porcentajes mucho más bajos) también se obtiene en ausencia de ClO₂ durante la desaparición de PEN a valores de pH ácidos menores que 1. La posibilidad que el ácido penílico provenga de la descomposición de PEN catalizada por ácidos, sin involucrar al ClO₂, fue descartada basándonos en los blancos de control previamente comentados a pH 3.5 en los cuales se observa una conversión de PEN baja en ausencia de ClO₂ (ver Figura 6.2b). Con respecto al mecanismo de reacción entre PEN y ClO₂, que hemos demostrado que reacciona con una estequiometría 1:1, una posibilidad razonable basada en la literatura es la de que el proceso implica una transferencia inicial de electrón entre PEN actuando como dador y el ClO₂ como aceptor¹². Posteriormente el catión radical de PEN experimenta más transformaciones (ver abajo). A fin de obtener pruebas experimentales que apoyen este mecanismo de transferencia electrónica se hizo reaccionar a pH 7 PEN con tris(4-bromofenil)aminio hexafluoroantimoniato (TPA⁺AsF₆⁻) que es un conocido reactivo que actúa como aceptor de electrones¹⁷. En presencia de TPA⁺AsF₆⁻ como aceptor de electrones observamos igualmente una conversión completa de PEN a ácido penílico.



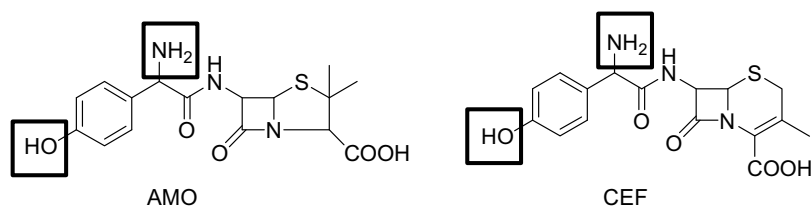
Esquema 6.1. Reacción y mecanismo propuesto de PEN promovido por ClO₂ o TPA⁺ AsF₆⁻.

Basándonos en la reactividad de PEN con TPA⁺ y la conocida capacidad del ClO₂ de actuar como un reactivo aceptor de un electrón, proponemos que el ácido penílico se forma de acuerdo con el mecanismo de reacción mostrado en el Esquema 6.1.

La N-(2-fenilacetil)glicina derivaría de la cicloversión [2+2] del anillo de la β-lactama dando lugar a una cetena como intermedio de reacción que después de la hidratación daría lugar al ácido carboxílico final (Esquema 6.1).

6.2.2 Reacción del ClO₂ con amoxicilina y cefadroxil

Extendimos nuestro estudio a otros dos de los antibióticos de más amplio uso denominados amoxicilina (AMO) y cefadroxil (CEF) y que además son contaminantes emergentes en las aguas. Las estructuras químicas de AMO y CEF se indican en el Esquema 6.2. Las principales diferencias de estos dos compuestos con PEN es la presencia de dos subunidades altamente reactivas frente al ClO₂ como son una amina primaria y un anillo fenólico. Por lo tanto, se podría anticipar una mayor reactividad de estos dos antibióticos frente al ClO₂ en comparación con PEN.



Esquema 6.2. Estructuras de AMO y CEF y los sitios potenciales de reacción con el ClO₂ remarcados con cuadrados. El grupo amino: no es reactivo a pHs bajos y es reactivo a pHs básicos. El grupo fenólico aumenta la reactividad total del anillo de fenilo a cualquier pH

De acuerdo con el estudio previo llevado a cabo con PEN procedimos a determinar la estequiometría de la reacción entre el ClO₂ y AMO ó CEF. La Figura 6.4 muestra un diagrama de barras presentando el porcentaje de desaparición de estos antibióticos a pH 8 en función del número de equivalentes de ClO₂ añadidos al medio de reacción. A partir de estos datos puede concluirse que también para estos dos antibióticos la estequiometría de la reacción es 1 a 1 reaccionando 1 mol de ClO₂ reacciona con 1 mol de cualquiera de dos compuestos β-lactámicos.

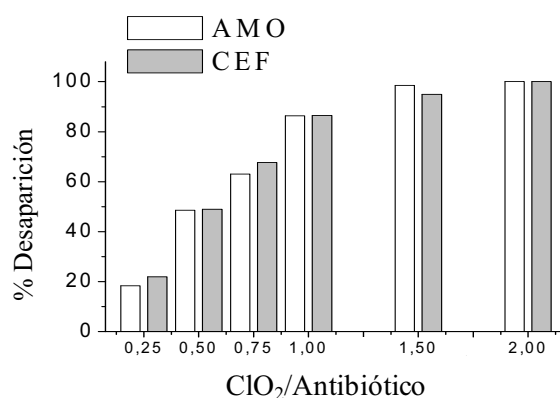


Figura 6.4. Estequiometría de la reacción entre el ClO₂ y los antibióticos β-lactámicos AMO y CEF a pH 8 y después de 1 min de reacción.

La conversión temporal para las reacciones de AMO y CEF con el ClO₂ también se siguió a diferentes valores de pH. La Figura 6.5 muestra el perfil temporal del consumo de ClO₂ y de la desaparición de antibiótico frente al tiempo de reacción a pH 4. Ambos antibióticos, AMO y CEF, se comportan de forma similar en todo el rango de pH estudiado y presentan la misma estequiometría 1:1. Es interesante resaltar, el hecho que AMO y CEF muestran una reactividad diferente con el pH con respecto a PEN. Así pues, mientras que para observar reacción del ClO₂ con PEN se requieren valores de pH ácidos, AMO y CEF no descomponen completamente en presencia de ClO₂ a valores de pH ácidos y en

contraste reaccionan rápidamente con conversiones elevadas a pH 8 (100% de conversión en menos de 4 min). La relevancia de la influencia del pH en la reactividad con el ClO₂ es que mientras PEN no reaccionaría en el proceso de potabilización con el ClO₂ donde el pH de las aguas se puede encontrar entre 6,5 y 8,0, tanto AMO como CEF reaccionarían fácilmente y se transformarían completamente debido al ClO₂ bajo las condiciones de desinfección habituales si el agente desinfectante fuese el ClO₂.

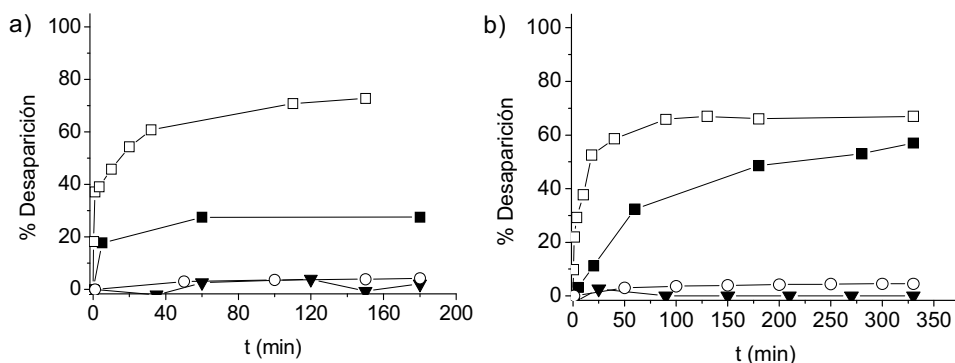
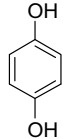
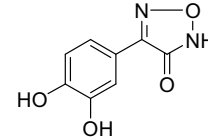


Figura 6.5. Gráfico de conversión temporal para la reacción de AMO (a) y CEF (b) (1 mg L⁻¹ TOC) con el ClO₂ (2 equivalentes ClO₂ frente a 1 equivalente de sustrato) a pH 4 y temperatura ambiente. ▼ Desaparición del antibiótico en ausencia de ClO₂. ■ Desaparición del antibiótico por reacción con ClO₂. □ Consumo de ClO₂ en presencia de antibiótico ○ Desaparición de ClO₂ en ausencia de antibiótico

Estos resultados, particularmente las diferencias tan marcadas en los patrones de reactividad entre PEN y AMO y CEF pueden interpretarse basándose en las diferencias estructurales entre PEN por un lado y de AMO y CEF por otro. Así, los resultados obtenidos se pueden justificar asumiendo que la unidad estructural común 2-(4-hidroxifenil)-2-aminoacetyl presente en AMO y CEF es la responsable de este comportamiento. Por un lado la presencia del grupo hidroxilo en el anillo aromático aumenta la reactividad total de AMO y CEF, mientras que, por otro, la presencia del grupo amino básico que estará totalmente protonado a pH inferior a 8 desfavorece fuertemente la reacción de AMO y CEF a valores bajos de pH. El Esquema 6.2 ilustra la propuesta para racionalizar el diferente comportamiento entre AMO, CEF y PEN con respecto al pH.

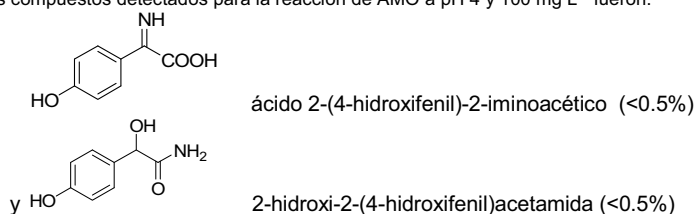
Los productos de reacción de AMO y CEF con ClO₂ se determinaron bajo aquellas condiciones en las cuales el ClO₂ reacciona completamente con los dos antibióticos β-lactámicos (pH 8). La identificación de productos se basó en el espectro de masas de la mezcla de reacción después de siliación de esta mezcla con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con trimetilclorosilano (BSTFA + 10%TMCS). La Tabla 6.1 muestra los productos caracterizados en la reacción de AMO y CEF con el ClO₂.

Tabla 6.1. Productos detectados (y sus porcentajes) en la reacción de AMO y CEF con ClO₂ (razón sustrato a ClO₂ 1:2) a diferentes pHs ^a.

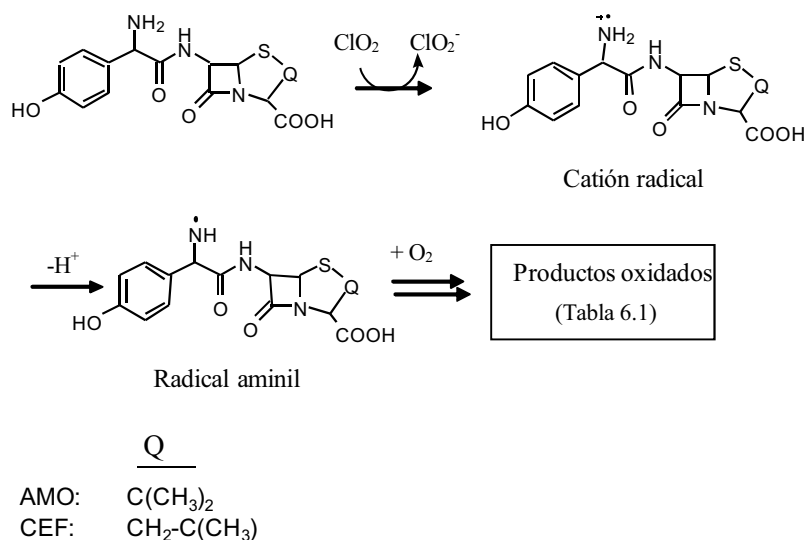
	 Hidroquinona (%)	 4-(3,4-dihidroxiifenil)-3(2H)-ona-1,2,5-oxadiazol (%)
AMO pH 8, 10 mg L ⁻¹	8	0
AMO pH 8, 100 mg L ⁻¹	2	6
AMO pH 4, 100 mg L ⁻¹ ^b	3	0.5
CEF pH 8, 10 mg L ⁻¹	13.4	0
CEF pH 8, 100 mg L ⁻¹	2.5	4
CEF pH 4, 100 mg L ⁻¹	1	1.5

a) La desaparición de los antibióticos de partida fue completa. También se observaron otros productos por CG-MS después de la siliación aunque no pudieron ser identificados. La posibilidad de que algunos productos de reacción no sean detectables por CG es probable.

b) Otros compuestos detectados para la reacción de AMO a pH 4 y 100 mg L⁻¹ fueron:



El Esquema 6.3 muestra un posible mecanismo de reacción compatible con todos los datos disponibles. En ambos casos, la reacción comienza a través de la transferencia de un electrón a partir del par solitario de electrones del grupo amino al ClO₂, formando el correspondiente catión radical aminio y el anión clorito. Este catión radical aminio evolucionará hacia la desprotonación del grupo N-H dando lugar a un radical aminil. Este radical puede acoplarse con el ClO₂, oxígeno o con otra especie de oxígeno radicalaria presente en el medio para formar hidroxilamina e hidroxiliminas. Eventualmente todos los intermedios estos derivados acabarán en hidroquinona.



Esquema 6.3. Mecanismo propuesto para la reacción de AMO y CEF con ClO₂

6.3 Influencia del pretratamiento con ClO₂ en la formación de THMs durante el proceso de cloración

Una de las principales ventajas por la que se propone el uso del ClO₂ como agente desinfectante en la potabilización de aguas es la reducción del contenido de THMs respecto a un tratamiento convencional basado en el uso extensivo del cloro¹². Por lo tanto, es de interés determinar si el pretratamiento de los tres antibióticos objeto de estudio con el ClO₂ se refleja o no en una reducción en la formación de THMs durante el proceso de cloración posterior. Considerando el estudio previo demostrando la reacción estequiométrica de los antibióticos con el ClO₂, se trata ahora de correlacionar esta reactividad del ClO₂, con los antibióticos con variaciones en el contenido de THMs formados en la etapa de cloración.

Con objeto de estudiar la influencia del pretratamiento del ClO₂ en la formación de THMs, se prepararon disoluciones acuosas de los antibióticos en agua Milli-Q a pH 8, trabajando a una concentración de 1 ó 2 mg L⁻¹, y se trataron con diferentes dosis de ClO₂. Después de 3 h del tratamiento con el ClO₂, las muestras se sometieron a cloración y se midió la formación de THMs tras un tiempo de contacto con cloro de 24 h a 20 °C. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Formación de THMs en el proceso de cloración (10 mg L⁻¹) a 20 °C de un agua sintética de antibiótico (COT, 2 y 1 mg L⁻¹) a pH = 8 en función del pretratamiento con ClO₂. Tiempo de contacto de ClO₂ 3 h y de 24 h para el ClO₂.

	Razón molar ClO ₂ / antibiótico	THMs, µg L ⁻¹	Reducción de THMs, %
AMO (2 mg L ⁻¹ COT)	0	27,1	-
	3	25,1	7,6
	7,5	17,5	35,6
	8	13,4	46,2
AMO (1 mg L ⁻¹ COT)	0	23,9	-
	0,35	14,3	40
	0,75	15,3	36
	1	16,4	32
	4	14,1	41
CEF (2 mg L ⁻¹ COT)	8	10,0	59
	0	63,5	-
	4	47,8	24,8
	8	30,6	51,9
CEF (1 mg L ⁻¹ COT)	0	47,0	-
	0,75	42,4	6,2
	1	42,2	10,2
	4	38,2	10,1
PEN (2 mg L ⁻¹ COT)	0	10,3	-
	1	10,7	0
	2	12,0	0
	4	10,3	0
	6	10,4	0
	8	14,7	0

Observamos que la adición de ClO₂ a pH 8 en diferentes dosis no influye en la formación de THMs después de tratar a PEN con cloro. Este resultado es consistente con la falta de reacción del ClO₂ con PEN a pH 8 que se ha comentado previamente.

Por el contrario en el caso de AMO y CEF se observa la reducción de THMs si se realiza un pretratamiento con ClO₂ a pH 8. El porcentaje de reducción de THMs guarda relación con la cantidad de ClO₂ usada en el pretratamiento. El mayor porcentaje de reducción de THMs se produce con la mayor dosis de ClO₂. Esta reducción en la formación de THMs después del tratamiento con ClO₂ se observó trabajando a las dos concentraciones de antibióticos de 1 y 2 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos demuestran que la reducción de THMs por el pretratamiento con ClO₂ es un fenómeno general. También es digno de destacar el hecho que la formación de THMs depende en gran medida de la naturaleza del antibiótico. AMO y CEF teniendo una subestructura fenólica son los antibióticos que muestran una mayor tendencia a formar THMs. Por otro lado, la menor reactividad de PEN a pH 8 también se manifiesta en una menor formación de THMs. Además, el pretratamiento con ClO₂ no afecta al valor de THMs que se alcanza en aguas conteniendo PEN.

Los resultados anteriores relativos a la formación de THMs se pueden interpretar asumiendo que en los casos de AMO y CEF el ClO₂ reacciona con la molécula original para dar lugar a productos de descomposición. La mayor dosis de ClO₂ da lugar a la mayor descomposición del antibiótico inicial puesto que hemos demostrado que la reacción con ClO₂ es estequiométrica.

Así pues, si después del tratamiento con ClO₂ se añade cloro la formación de THMs (medidos en µg L⁻¹) se reduce significativamente simplemente porque el ClO₂ ya ha reaccionado y degradado una parte del antibiótico que de otra manera reaccionaría con el cloro. Esta explicación asume que los productos de reacción tienen menos tendencia a formar THMs que los antibióticos de partida. Hay que tener en cuenta el hecho que los THMs (µg L⁻¹) sólo corresponden a una fracción muy pequeña del carbono orgánico total (COT, mg L⁻¹). Posiblemente este pequeño porcentaje corresponde a la fracción más reactiva de los compuestos orgánicos disueltos en el agua. Aparentemente esta pequeña fracción reactiva es la que reacciona antes con ClO₂. Así pues, nuestro estudio permite proponer una hipótesis razonable sobre el mecanismo de acción del ClO₂ y sobre el porqué este agente desinfectante es efectivo reduciendo el contenido en THMs de aguas tratadas. Sólo en aquellos casos en los que el ClO₂ reacciona con los sustratos orgánicos sería cuando se observaría una disminución en la formación de THMs.

6.4 Conclusiones

De forma general, los resultados presentados en este capítulo son relevantes para entender cómo el ClO₂ puede reaccionar con antibióticos que son contaminantes emergentes en el agua. Nuestro estudio plantea la cuestión sobre el impacto que los subproductos provenientes de la reacción de agentes antibióticos con los desinfectantes del agua pueden tener en los consumidores y en la resistencia de los microorganismos hacia los antibióticos.

6.5 Referencias bibliográficas

- [1] M.L. Richardson, J.M. Bowron, The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J.Pharm.Pharmacol.* 37(1985), 1-12
- [2] T. Heberer, H.J. Stan, Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water, *Vom Wasser* 86 (1996) 19-31.
- [3] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.* 225(1999), 109-118.
- [4] T.A. Ternes, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.* 32(1998), 3245-3260.
- [5] T.A. Ternes, M. Meisenheimer, D. McDowell, F. Sacher, H.-J. Brauch, B. Haist-Gulde, G. Preuss, U. Wilme, N. Zulei-Seibert, Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment, *Environ. Sci. Technol.* 36(2002), 3855-3863.
- [6] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, M. Llombart, C. Garcia-Jares, I. Rodriguez, M. Gomez, T. Ternes, Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Res.* 38(2004), 2918-2926.
- [7] P.E. Stackelberg, E.T. Furlong, M.T. Meyer, S.D. Zaugg, A.K. Henderson, D.B. Reissman, D.B., Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant, *Sci. Total Environ.* 329(2004), 99-113.
- [8] D. Bendz, N.A. Paxeus, T.R. Ginn, F.J. Loge, Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden, *J. Hazard. Mater.* 122(2005), 195-204.
- [9] E.M. Aieta, J.D. Berg, A review of chlorine dioxide in drinking water treatment, *J. Am. Water Works Assoc.* 78(1986), 62-72.
- [10] A.G. Myers, A.G., Evaluating alternative disinfectants for THM control in small systems, *J. Am. Water Works Assoc.* 82(1990), 77-84.
- [11] G.C. White, *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, 4th Edition (1988).
- [12] C. Rav-Acha, Transformation of aqueous pollutants by chlorine dioxide: reactions, mechanisms and products, *Handbook of Environmental Chemistry* 5(Pt. C), (1998) 143-175.
- [13] B.W. Lykins, M.H. Griese, Using chlorine dioxide for trihalomethane control, *J. Am. Water Works Assoc.* 78(1986), 88-93.
- [14] J.R. McVeigh, R.G. Lee, D.L. Kelleher, Chlorine dioxide use in pretreatment for control of trihalomethane generation, *Proceedings - Annual Conference, AWWA*, (1985) 825-839.
- [15] EU. Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, *Official J. Eur. Commun.* L 330 (1998) 32-54.
- [16] M.M. Huber, S. Korhonen, T.A. Ternes, U. von Gunten, Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide, *Water Res.* 39(2005) 3607-3617.
- [17] F.A. Bell, A. Ledwith, D.C. Sherrington, Cation-radicals: tris(p-bromophenyl)amminium perchlorate and hexachloroantimonate, *J. Am. Chem. Soc.* C 19 (1969), 2719-2720.
- [18] D.P. Kessler, M. Cushman, I. Ghebre-Sellassie, A.M. Knevel, S.L. Hem, Investigation of a proposed penicillin G acidic degradation scheme using high-pressure liquid chromatography and optimization techniques and mechanistic considerations, *Perkin Trans. 2* (1972-1999) (1983), 1699-1703.
- [19] G.P. Nora, M.J. Miller, U. Moellmann, The synthesis and in vitro testing of structurally novel antibiotics derived from acylnitroso Diels-Alder adducts, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* 16(2006), 3966-3970.
- [20] C.H. Huang, J.E. Renew, K.L. Smeby, K. Pinkston, D.L. Sedlak, Assessment of Potential Antibiotic Contaminants in Water and Preliminary Occurrence Analysis. The 2nd International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water, National Ground Water Association, Minneapolis, MN, October (2001).
- [21] R.H. Becker, S.J. Nicoson, D.W. Margerum. Nucleophile assistance of electron-transfer reactions between nitrogen dioxide and chlorine dioxide concurrent with the nitrogen dioxide disproportionation. *Inorg. Chem.* 42 (2003) 7938-7944.

Capítulo 7

**Reacción del dióxido de cloro con tres
amino ácidos representativos en
agua.**

7.1 Introducción

Como se viene comentando el uso del ClO_2 como preoxidante en los procesos de potabilización en sustitución del cloro tiene una influencia beneficiosa en la reducción de la formación de trihalometanos (THMs) en la etapa posterior de cloración¹⁻¹⁷. Se ha propuesto que el origen de esta reducción en la formación de THMs cuando se emplea ClO_2 es la escasa tendencia de este reactivo a formar moléculas cloradas¹⁸. Sin embargo esta justificación por sí sola no explica porqué la adición posterior de cloro no produce los mismos niveles de THMs que en los casos en los que no se ha procedido al pretratamiento con ClO_2 .

Tal y como se ha indicado en los Objetivos el presente Capítulo persigue conseguir nuevos datos sobre el mecanismo de actuación del ClO_2 como agente desinfectante de aguas. A tal fin, en este Capítulo hemos llevado a cabo un estudio de los productos de reacción del ClO_2 con algunos aminoácidos representativos en el agua. Además de los ácidos húmicos y fúlvicos otros constituyentes, naturales de las aguas superficiales son los péptidos^{19,20} y glúcidos derivados de plantas y microorganismos²¹⁻²⁵. Como se ha indicado en el Capítulo anterior una de las principales hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que el efecto positivo del tratamiento con ClO_2 en la reducción del contenido de THMs podría ser debido a la diferente reactividad específica del ClO_2 , respecto al cloro, con carbohidratos y péptidos. En este contexto, mientras que la mayoría de los estudios sobre la formación de THMs se ha limitado a estructuras fenólicas, algunos trabajos²⁶ han demostrado que cuando el cloro reacciona con algunos aminoácidos se pueden formar concentraciones elevadas de THMs.

Aunque hay algunos precedentes sobre la reactividad del ClO_2 con aminoácidos^{27,28}, en ellos no se ha procedido a la identificación de la estructura química de los productos derivados de la reacción de estos sustratos orgánicos naturales con el ClO_2 bajo condiciones y concentraciones relevantes para el tratamiento de las aguas potables²⁹. Sin embargo, pensamos que estudios sistemáticos sobre la distribución de productos formados en la reacción de compuestos orgánicos relevantes por su presencia en aguas con ClO_2 podría llevar eventualmente a entender el mecanismo de acción específica del ClO_2 por lo

que respecta a la reducción de THMs en agua potable tras su cloración. Además, la distribución real de productos podría depender de la cantidad de ClO_2 (relación molar entre el sustrato y el ClO_2) ya que podrían ocurrir reacciones catalíticas donde concentraciones bajas de ClO_2 fuesen suficientes para descomponer cantidades elevadas de sustratos orgánicos, ó reacciones en cascada donde los productos iniciales sufriesen una reacción posterior con otra molécula de ClO_2 . Por lo tanto, en lugar de determinar la identidad de los productos resultantes a una única relación molar de ClO_2 , es más informativo seguir la evolución de la distribución de productos en función de la concentración del ClO_2 . Esta metodología nunca ha sido aplicada hasta ahora al conocimiento del origen del efecto del pretratamiento con ClO_2 en la formación de THMs y en primer lugar podría contestar la cuestión de si la reacción de un compuesto orgánico dado es catalítica o estequiométrica desde el punto de vista del ClO_2 . Además es importante en procesos de degradación determinar el papel del oxígeno en la reacción del ClO_2 y establecer si hay un efecto sinérgico de la reactividad del ClO_2 debido a la presencia de oxígeno. Este punto puede ser estudiado simplemente llevando a cabo algunos experimentos de control en ausencia de oxígeno bajo atmósfera inerte.

7.2 Reacción de aminoácidos con ClO_2

En el presente trabajo hemos realizado un estudio de los productos de reacción del ClO_2 con una serie de aminoácidos cuya reactividad con ClO_2 ha sido previamente descrita³⁰⁻³³. Es pertinente comentar que aunque algunos datos cinéticos sobre la desaparición del ClO_2 en presencia de aminoácidos y péptidos³⁴ constituyen un precedente relacionado con nuestro trabajo, la estructura de los productos de reacción no ha sido objeto de estudio en ninguno de dichos precedentes. Los Esquemas 6.1-6.3 resumen nuestra propuesta sobre el mecanismo de reacción de tres aminoácidos con ClO_2 . La falta de datos relativos a la estructura de los productos de reacción de compuestos naturales con el ClO_2 ha hecho imposible hasta ahora el conocimiento de las razones de la reducción de los THMs al tratar las aguas con ClO_2 como agente desinfectante como etapa previa a la desinfección final por cloración.

7.2.1 Reacción del ClO₂ con triptófano

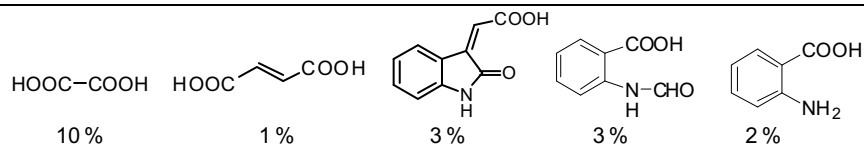
Cuando el triptófano se hizo reaccionar con un exceso de ClO₂ (relación molar 4:1 de ClO₂ respecto al triptófano, concentración de triptófano 10 mg L⁻¹, disoluciones acuosas aireadas, temperatura ambiente), la reacción tuvo lugar instantáneamente tal y como evidenció el cambio de color de amarillo (característico de las disoluciones acuosas del ClO₂) a marrón. Nuestra observación está de acuerdo con trabajos anteriores³⁴ en los que se han medido las cinéticas de desaparición del ClO₂ en la reacción del triptófano con ClO₂ empleando técnicas cinéticas rápidas con sistemas de flujo detenido.

En nuestro caso, el análisis de los productos de reacción ha permitido la detección de los compuestos indicados en la Tabla 7.1. Tal y como puede verse en dicha tabla, cuando el triptófano se trató con un exceso de ClO₂ los productos más abundantes fueron los ácidos oxálico y fumárico, acompañados de cantidades menores del ácido 2-aminobenzoico, el ácido N-formil-antranílico, y el ácido 2-(2-oxoindolin-3-iliden)acético. No se observaron más productos de reacción. Estos productos, particularmente la formación de ácidos carboxílicos de dos y cuatro carbonos, indican la existencia de una cascada de reacciones de degradación consecutivas en la que ocurre una serie de roturas del enlace carbono-carbono dando lugar a partir del triptófano a compuestos de bajo peso molecular.

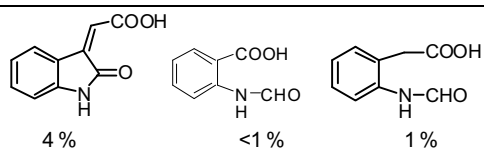
El análisis de productos anterior pone de manifiesto que la parte más robusta de la estructura del triptófano es la que corresponde a la unidad del ácido 2-aminobenzoico. El anillo de cinco elementos de indol es demasiado reactivo, teniendo lugar la apertura oxidativa del mismo³⁵. Estos productos de reacción están demasiado lejos de la estructura inicial del triptófano como para dar alguna información de los sitios iniciales de ataque del ClO₂ o para identificar los productos primarios de reacción con mayor número de carbonos.

Tabla 7.1. Distribución de productos observada para la reacción del ClO₂ con triptófano, a 20 °C, bajo atmósfera de oxígeno o argón empleando varias razones relaciones de reactivos. Los porcentajes de los productos han sido estimados empleando nitrobenzono como patrón cromatográfico externo y están dados respecto a los moles iniciales de triptófano.

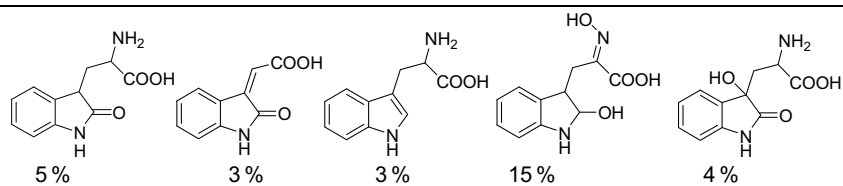
Relación molar Triptófano / ClO₂ 0.25, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4



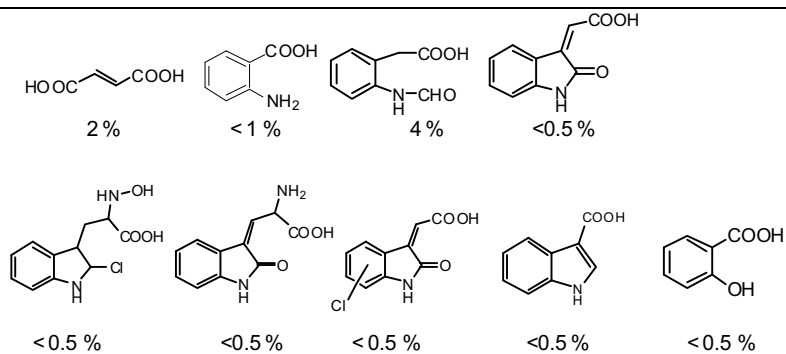
Relación molar Triptófano / ClO₂ 0.5, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4

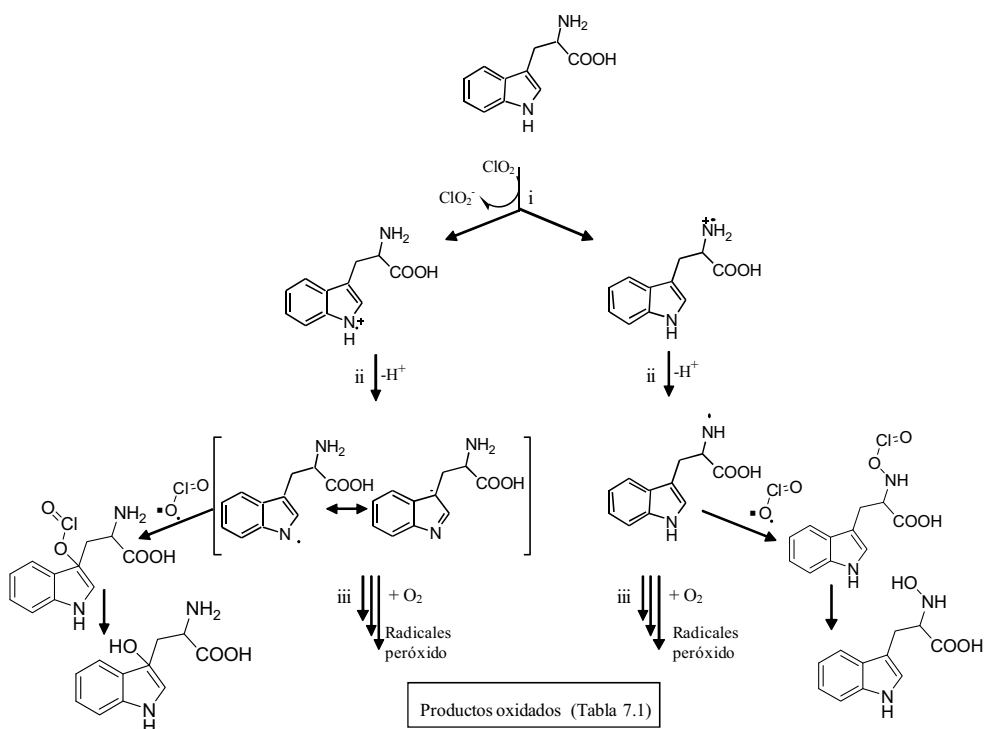


Relación molar Triptófano / ClO₂ 1, bajo atmósfera de argón, pH de 6 a 4



Relación molar Triptófano / ClO₂ 0.5, bajo atmósfera de oxígeno, pH tamponado a 7.5





Esquema 7.1. Propuesta del mecanismo de reacción para el ataque del ClO_2 al triptófano.

A fin de abordar específicamente el sitio por donde se produce el ataque inicial del ClO_2 al triptófano y también para ilustrar en qué medida la relación molar sustrato a ClO_2 influye en la distribución de productos, llevamos a cabo la misma reacción entre el triptófano y el ClO_2 con menor exceso de ClO_2 y en ausencia de oxígeno. El objetivo de este experimento es limitar el avance del proceso en cascada obteniendo información de las etapas primarias. Se llevó a cabo la reacción en ausencia de oxígeno a fin de evitar que este reactivo intervenga en la ruta de degradación.

Tal y como esperábamos, la distribución de productos en estas condiciones cambia completamente respecto a la comentada anteriormente donde se empleaban excesos de ClO_2 y se llevaba a cabo el proceso condiciones aerobias. También de acuerdo con nuestras expectativas la mayoría de los productos todavía contienen la mayor parte de los carbonos del esqueleto intacto o su estructura es muy similar a la del triptófano (ver Tabla 7.1).

Considerando la estructura de los productos se puede deducir que hay dos sitios competitivos y preferenciales en los cuales puede tener lugar la reacción del ClO_2 con el

triptófano (Esquema 7.1). Uno de ellos es el átomo de nitrógeno del aminoácido dando lugar a hidroxilaminas, oximas e iminas. En la química de compuestos nitrogenados orgánicos la oxidación de aminas a hidroxilaminas, oximas e iminas es una reacción conocida³⁶. Aunque no hay evidencias basadas en la distribución de productos obtenida, es muy probable que una oxidación posterior en esta posición daría lugar eventualmente a la pérdida de la cadena lateral desconectando las estructuras del indol y la del α -aminoácido. La rotura oxidativa del enlace C-C en las posiciones α a los heteroátomos, particularmente nitrógeno, es un proceso conocido³⁶.

Por otro lado, el ClO_2 también ataca a las posiciones 2 y 3 del anillo de indol produciendo inicialmente la hidroxilación del anillo con la consiguiente formación de un grupo carbonilo que eventualmente promovería la apertura del mismo. La química de los indoles ha sido objeto de numerosos estudios³⁷.

Una ruta de degradación razonable para tener en cuenta los productos observados se presenta en el Esquema 7.1. De acuerdo con este esquema, que es compatible con los datos termodinámicos basados en el potencial redox del triptófano y del ClO_2 , los productos formados en las degradaciones iniciales provendrían de un proceso de transferencia de un electrón. La donación de un solo electrón es un proceso muy general en aminas aromáticas y heterociclos que genera el catión radical correspondiente y que pueden dar lugar a la degradación del compuesto³⁸. En el proceso, el ClO_2 se convertiría en clorito mientras que se formaría un catión radical del triptófano altamente reactivo (Esquema 7.1).

La voltametría cíclica del triptófano en disolución acuosa muestra un potencial de oxidación alrededor de +1,0 V vs NHE³⁹ y por lo tanto debe ser fácilmente oxidado por el ClO_2 ⁴⁰ ($E_{\text{ox}} = 1,27$ V vs ENH). Dos son los posibles sitios del triptófano que pueden dar el electrón al ClO_2 , bien a partir del par de electrones solitarios del nitrógeno del aminoácido o a partir del anillo heterocíclico de cinco miembros, rico en electrones, de la estructura del indol. Después de la transferencia del electrón, el catión radical del triptófano puede evolucionar dando un protón y formar el correspondiente radical que podría acoplarse con ClO_2 . En este sentido debemos recordar el carácter de radical del ClO_2 . Así pues, el ClO_2 atacaría al radical derivado del triptófano formando un enlace covalente y dando lugar a un clorito el cual se hidrolizaría a un derivado hidroxilado del triptófano. Alternativamente los intermedios catión radical o radical pueden reaccionar con el oxígeno disuelto cuando la reacción tiene lugar en condiciones aeróbicas. Así pues, el ClO_2 muestra como sitios de ataque preferencial bien el nitrógeno del aminoácido o bien los C-2 y C-3 del anillo de indol (Esquema 7.1). Además, en ausencia de oxígeno, si hay un exceso de ClO_2 , estos productos primarios serán inestables y continuarán su camino hacia mayores degradaciones por reacciones consecutivas con el ClO_2 (ver Esquema 7.1).

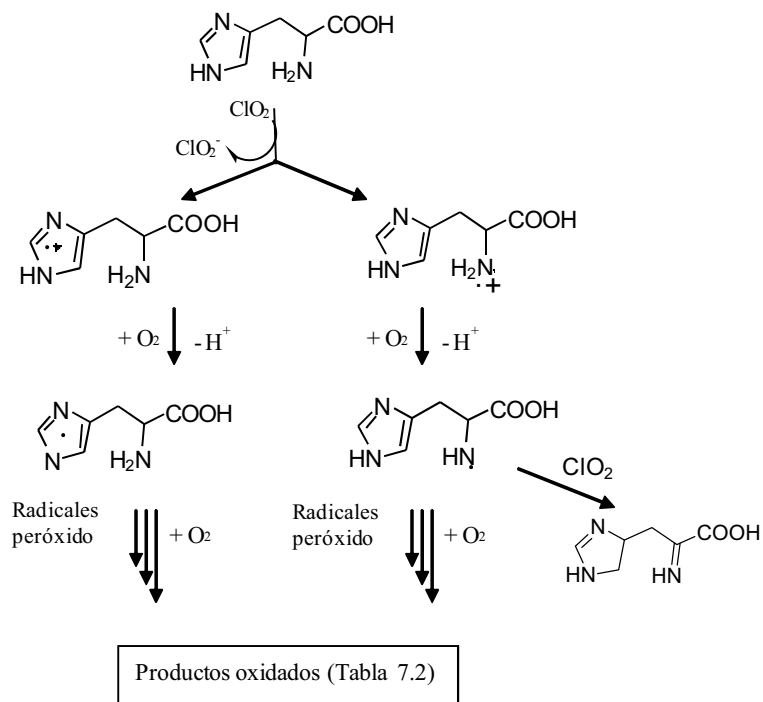
Dependiendo de la posición del segundo y subsiguientes ataques tienen lugar caminos de degradación divergentes (Esquema 7.1). Cuando el ataque ha ocurrido inicialmente en el nitrógeno del aminoácido, la ruta de reacción probablemente continúa con la formación de enlaces múltiples carbono-nitrógeno y descarboxilación que explica algunos de los productos de la Tabla 7.1 tales como el ácido (2-(hidroxiimino)-3(2-hidroxiindolin-3-il))propanoico, ácido (3-(2-cloroindolin-3-il)-2-(hidroxiamino)propanoico), ácido (2-(2-oxoindolin-3-ilideno) acético, ácido indol-3-carboxílico etc. Cuando el ataque inicial es en el anillo del indol podrían ocurrir más hidroxilaciones y la formación de cetonas dando lugar eventualmente a la apertura del anillo heterocíclico [ácido (2-amino-3-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il))propanoico, ácido (N-formil)antranílico]. De acuerdo con la distribución de productos observada para la menor relación molar sustrato a ClO_2 parece que el ataque al anillo de indol es más favorable dando lugar a mayores rendimientos de productos que el ataque al nitrógeno del aminoácido³⁷. El último ataque daría lugar a productos con un número menor de átomos de carbono debido a reacciones de ruptura C-C de la cadena lateral.

En resumen de acuerdo con nuestros datos, el ClO_2 inicia el ataque al triptófano con la abstracción de un electrón y con los subsiguientes procesos oxidativos de acoplamiento de radicales. El oxígeno no es necesario en las etapas iniciales pero, si está presente en el medio de reacción, interviene interceptando los radicales y dando lugar a productos oxigenados.

7.2.2 Reacción de la histidina con ClO_2

El anterior marco conceptual para entender la degradación del triptófano también sirve en parte para explicar la degradación de la histidina con el ClO_2 (Esquema 7.2). Así pues, bajo las condiciones en las cuales hay un exceso de ClO_2 con respecto a la histidina, y trabajando en condiciones aerobias, tienen lugar muchas etapas de degradación consecutivas dando lugar a compuestos de uno a cinco átomos de carbono tal y como se indica en la Tabla 7.2. La degradación de la histidina en estas condiciones anaeróbicas no es una reacción en cadena que requiera cantidades catalíticas de ClO_2 puesto que cuando la relación molar histidina / ClO_2 es 10 la mayor parte de la histidina permanece inalterada incluso en presencia de oxígeno. No obstante, el papel del oxígeno promoviendo la descomposición después del ataque estequiométrico del ClO_2 se pone de manifiesto por el hecho que tratando la histidina con ClO_2 bajo atmósfera de argón se observa una distribución de productos diferente, donde los productos primarios provienen del ataque preferencial del ClO_2 al átomo de nitrógeno del aminoácido siendo en el caso de la histidina el producto principal de reacción el ácido 4-imidazolil acético. Tal y como en el caso del

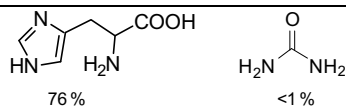
triptófano, este compuesto primario de nuevo no es estable, y si hay disponible un exceso de ClO_2 , empiezan a aparecer compuestos heterocíclicos hidroxilados que eventualmente pueden dar lugar a la ruptura de la cadena lateral y a la apertura del anillo heterocíclico. La Tabla 7.2 contiene un resumen de los productos caracterizados en función de la relación molar de ClO_2 y de la presencia o ausencia de oxígeno.



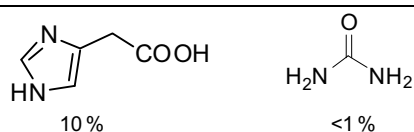
Esquema 7.2. Propuesta del mecanismo de reacción para el ataque del ClO_2 a la histidina.

Tabla 7.2. Distribución de productos observada en la reacción del ClO₂ con histidina, a 20 °C, bajo atmósfera de oxígeno o argón empleando varias relaciones molares de reactivos. Los porcentajes de los productos han sido estimados empleando nitrobenzeno como patrón cromatográfico externo y están dados respecto a los moles iniciales de histidina.

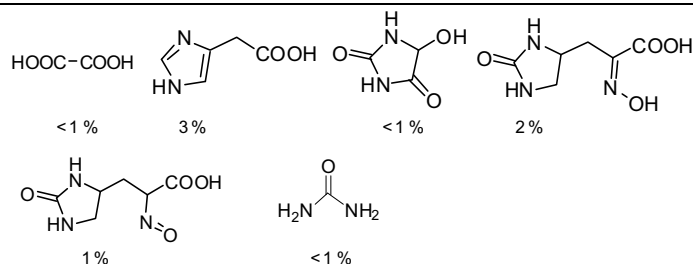
Relación molar Histidina / ClO₂ 10, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4



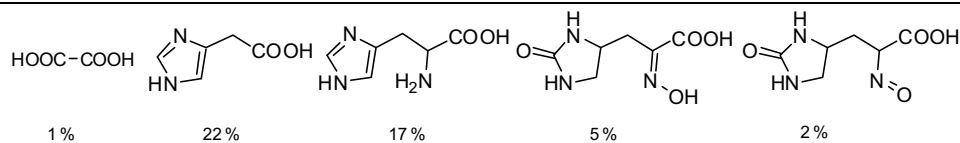
Relación molar Histidina / ClO₂ 1, bajo atmósfera de argón, pH de 6 a 4



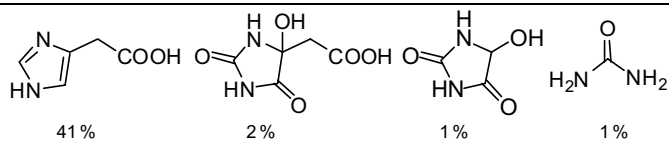
Relación molar Histidina / ClO₂ 1, bajo atmósfera de oxígeno, pH tamponado a 7,5



Relación molar Histidina / ClO₂ 1, bajo atmósfera de argón, pH tamponado a 7,5



Relación molar Histidina / ClO₂ 0,33, bajo atmósfera de argón, pH de 6 a 4



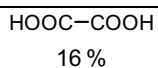
7.2.3 Reacción del ClO₂ con Tirosina

La misma metodología aplicada anteriormente, es decir, el estudio de la variación de la distribución de productos empleando diferentes relaciones molares de sustrato respecto al ClO₂ y en presencia o ausencia de oxígeno, se aplicó a la tirosina a fin de conocer los mecanismos de degradación a través del estudio de los productos resultantes de la degradación. La distribución de productos caracterizados tras el tratamiento de la tirosina con ClO₂ se muestra en la Tabla 7.3. Tal y como en los casos anteriores, cantidades estequiométricas de ClO₂ en ausencia de oxígeno da lugar a productos similares estructuralmente y que todavía están próximos a la estructura inicial de la tirosina.

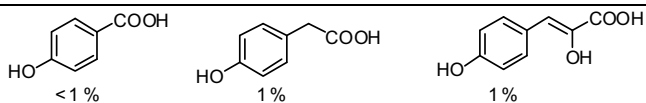
Recientemente se ha estudiado la oxidación con ClO₂ de tirosina en presencia de oxígeno empleando cantidades subestequiométricas de ClO₂²⁹ observándose por espectroscopia de UV la formación de 3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina (L-DOPA). Por el contrario, en nuestro caso, un exceso de ClO₂ en presencia de oxígeno da lugar a cadenas cortas y ácidos carboxílicos altamente funcionalizados muy lejos estructuralmente de la estructura inicial de la tirosina. Este hecho de nuevo indica que el oxígeno atmosférico está interceptando especies radicalarias dando lugar a una degradación masiva de la estructura inicial. Combinando la información que proporciona la distribución de productos de reacción bajo diferentes condiciones, se obtiene un mayor conocimiento del camino de reacción que permite proponer un mecanismo razonable de degradación. Basándonos en la Tabla 7.3, se propone la ruta de degradación que se indica en el Esquema 7.3. De manera similar a los ejemplos de los dos casos anteriores las etapas iniciales de reacción consisten en la oxidación de la tirosina por transferencia de un electrón, seguida por una serie de acoplamiento de radicales y descarboxilación de la cadena fenólica lateral. De esta manera, se forman ácidos fenólicos carboxílicos con tres o menos carbonos alifáticos. Además, de manera competitiva también está ocurriendo la hidroxilación del anillo aromático dando lugar a derivados de hidroquinona que eventualmente dará lugar a la ruptura del anillo de benceno y a la formación de ácidos di- y policarboxílicos. De nuevo la hidroxilación puede tener lugar por acoplamiento del ClO₂ con un radical centrado en el carbono y la hidrólisis del correspondiente clorito de éster o por interceptación y reacción con oxígeno de los radicales centrados en el carbono.

Tabla 7.3. Distribución de productos observada para la reacción del ClO₂ con tirosina, a 20 °C, bajo atmósfera de oxígeno o argón empleando varias relaciones molares de reactivos. Los porcentajes de los productos han sido estimados empleando nitrobenzeno como patrón cromatográfico externo y están dados respecto a los moles iniciales de tirosina.

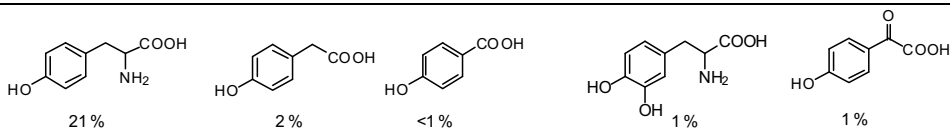
Relación molar Tirosina / ClO₂ 0,25, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4



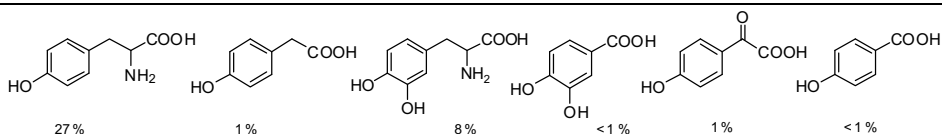
Relación molar Tirosina / ClO₂ 0,4, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4



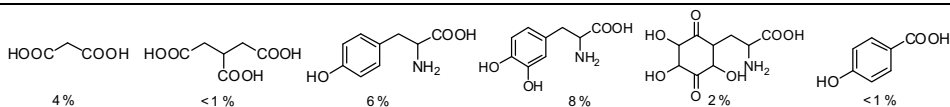
Relación molar Tirosina / ClO₂ 1, bajo atmósfera de oxígeno, pH de 6 a 4



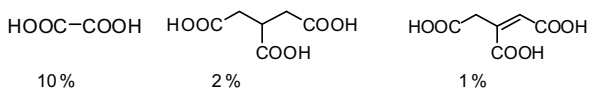
Relación molar Tirosina / ClO₂ 1, bajo atmósfera de argón, pH de 6 a 4

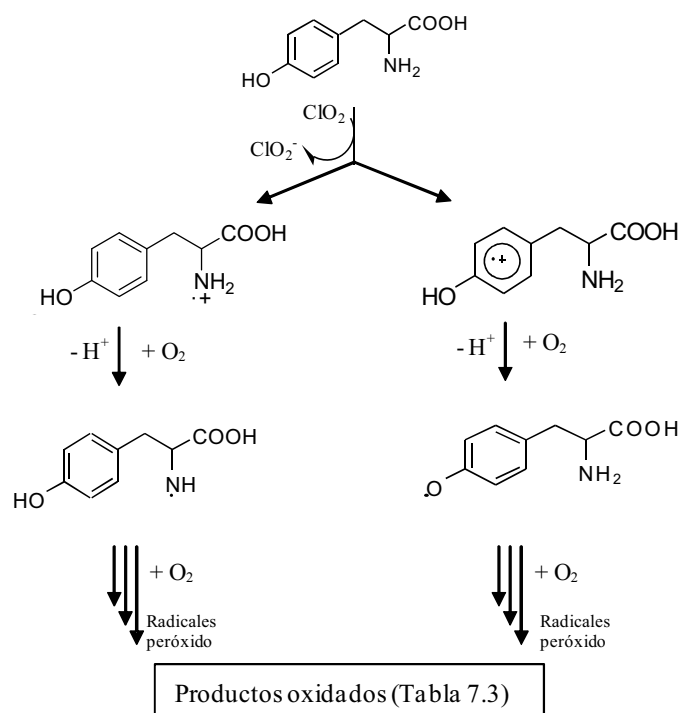


Relación molar Tirosina / ClO₂ 0,5, bajo atmósfera de oxígeno, pH tamponado a 7,5



Relación molar Tirosina / ClO₂ 0,25, bajo atmósfera de oxígeno, pH tamponado a 7,5





Esquema 7.3. Propuesta del mecanismo de reacción para el ataque del ClO_2 a la tirosina.

7.3 Influencia del pretratamiento con ClO₂ en la formación de THMs

En las secciones anteriores hemos demostrado que el ClO₂ reacciona estequiométricamente incluso en ausencia de oxígeno con los tres aminoácidos objeto de estudio. Por tanto en disoluciones que contienen alguno de estos aminoácidos y que se someten a pretratamiento con ClO₂ antes de cloro final es evidente que el cloro residual ya no reaccionaría con los aminoácidos sino con los subproductos que deriven de ellos. En este sentido es de interés establecer si la concentración de trihalometanos varía y disminuye cuando se comparan disoluciones del mismo aminoácido con y sin pretratamiento con ClO₂. Para establecer este punto se llevaron a cabo medidas de formación de THMs de disoluciones modelo de estos tres aminoácidos sin someter a pretratamiento con ClO₂ o tras ser sometidos a pretratamiento con 1,4 mg L⁻¹ de ClO₂. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4. Efecto del pretratamiento de disoluciones de aminoácidos con ClO₂ en el contenido en CHCl₃

	CHCl ₃	Porcentaje de reducción (%)	Cl ₂ residual (mg L ⁻¹)
Triptófano			
0	47,6	--	4,8
1,4	24,2	49,2	5,7
Tirosina			
0	40,6	--	5,8
1,4	31,2	23,2	7,7
Histidina			
0	11,1	--	6,4
1,4	9,7	12,6	8,1

Condiciones de reacción: 1 mg L⁻¹ sustrato, pH 8, 3 h ClO₂, 24 h ClO⁻, 10 mg L⁻¹ Cl₂

Como puede verse en la Tabla 7.4 la concentración de trihalometanos se reduce en los tres casos estudiados cuando las disoluciones han sido tratadas por ClO₂ con anterioridad a su cloración. En el caso del triptófano la reducción que se alcanza es notable. Más aún como puede verse en la misma Tabla la cantidad de cloro residual a las 24 h es sensiblemente mayor si las disoluciones han sido pretratadas con ClO₂. Esto indica su menor consumo de cloro. Los resultados de la Tabla se pueden interpretar admitiendo que durante el pretratamiento el ClO₂ reacciona con los aminoácidos dando lugar a productos de degradación los cuales son menos reactivos frente a la cloración.

Pensamos que este tipo de interpretación es más general de los resultados que muestra la Tabla y que puede servir para racionalizar la observación frecuente de que pretratamiento con ClO_2 reduce la formación de THMs y disminuye el consumo de cloro.

7.4 Conclusiones

Por consiguiente, la aplicación de una metodología sistemática al estudio de la reacción de ClO_2 con aminoácidos en disoluciones acuosas consistente en variar la razón molar de ClO_2 y llevando a cabo la reacción en ausencia o en presencia de oxígeno ha permitido establecer que el ataque del ClO_2 se inicia en el átomo de nitrógeno o en las subestructuras aromáticas dadoras de electrones. Los productos primarios iniciales son inestables bajo las condiciones de reacción y continúan la degradación principalmente debido a una cascada de etapas de hidroxilaciones, formación de carbonilos, descarboxilaciones y apertura de anillos. Por otra parte la comparación de la concentración de trihalometanos que se forman en disoluciones de los aminoácidos es inferior y el consumo de cloro menor cuando estas disoluciones son pretratadas con ClO_2 .

Teniendo en cuenta la importancia creciente del tratamiento con ClO_2 en la potabilización de aguas nuestro estudio es relevante para aumentar la comprensión de los mecanismos que conducen a la reducción del potencial de trihalometanos comparado con el tratamiento convencional de cloración.

7.4 Referencias bibliográficas

- [1] S. Sussman, WJ Ward, Chlorine dioxide is an attractive water treatment alternative, *Water & Sewage Works* (1979) 120-121.
- [2] G.W. Miller, R.G. Rice, C.M. Robson, R.L. Scullin, W. Kuhn, An assessment of ozone and chlorine dioxide technologies for treatment of municipal water supplies. *Public Technol., Inc., Washington, DC, USA.* (1978), p. 81 pp.
- [3] AWWA Research Foundation & KIWA, Use of alternative disinfectants, *Chlorination By-Products: Production and Control.* (1992) 174-88.
- [4] E.M Aieta, J.D Berg. A view of chlorine dioxide in drinking water treatment. *J.AWWA* 78 (1986) 62-73.
- [5] L. Helin, B.Ling, Application of chlorine dioxide in water treatment. *Water Treat. Technol. China* 15 (1987) 174-78.
- [6] A.G. Myer, Evaluating alternative disinfectants for THM control in small systems. *J. AWWA* 82 (1990) 77-84.
- [7] G.C. White, *The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, 3rd edn., Van Nostrand Reinhold, New York. 150-151 (1992).
- [8] N.Narkis, A. Katz, F.Orshansky, Y.Kott, Y.Friedland, Disinfection of effluents by combinations of chlorine dioxide and chlorine. *Water Sci. Tech.* 31 (1995) 105-14.
- [9] K.M. Sutton, R. Elefritz, J. Milligan, THM control in wastewater effluent with chlorine dioxide as a supplementary oxidant. *Disinfection 2002, Health and Safety Achieved through Disinfection*, Conference Proceedings, St. Petersburg, FL, United States, Feb. 17-20, 2002 (2002) 152-65.
- [10] James M.Symons, O.Love, Jr.Thomas, C. Keith, Comparison of practical alternative treatment schemes f or reduction of trihalomethanes in drinking water. *Ozone/Chlorine Dioxide Oxid. Prod. Org. Mater., Proc. Conf.* (1978), Meeting Date. (1978) 443-55.
- [11] W. Benjamin, J.R.Lukins, H.Mark, Using chlorine dioxide for trihalomethane control. *Journal - American Water Works Association* 78 (1986) 88-93.
- [12] N.J.D. Graham, G.Reynolds, D Buckley, Laboratory simulation of disinfection regimes for trihalomethane control. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 3 (1989) 604-11.
- [13] James R.McVeigh, G.Lee Ramon, D.L.Kelleher, Chlorine dioxide use in pretreatment for control of trihalomethane generation. *Proceedings - Annual Conference, American Water Works Association.* (1995) 825-29.
- [14] S.W. Krasner, Chlorine dioxide treatment of drinking water: oxidant demand and byproduct formation. *Abstracts, 38th Western Regional Meeting of the American Chemical Society, Long Beach, CA, United States, October 15-18 (2003)* 122.
- [15] B.W. Long, R.F. Miller, A.A. Rosenblatt, Pilot study: the use of high-purity, chlorine-free chlorine dioxide to minimize trihalomethane formation. *Chemical Oxidation* 6 (1997) 126-33.
- [16] G. Gordon, B. Bubnis, Chlorine dioxide chemistry issues. *Chlorine Dioxide: Drinking Water, Process Water and Wastewater Issues, Symposium Proceedings, 3rd, New Orleans, Sept. 14-15, 1995* (1996) 1-15.
- [17] B.W. Lykins, M.H. Griese, Using chlorine dioxide for trihalomethane control. *Journal - American Water Works Association* 78 (1986) 88-93.
- [18] J. Hoigné, H. Bader, Kinetics of reactions of chlorine dioxide (OCIO) in water-I. Rate constants for inorganic and organic compounds. *Water research* 28 (1994) 45-55.
- [19] C. Le Cloirec, P. Le Cloirec, M. Elmghari, J.Morvan, G. Martin, Concentration and analysis of numerous nitrogenous organic substances in natural waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 14 (1983) 127-45.
- [20] M.H. Briggs, The presence of free sugars, peptides, and amino acids in filtered lake waters. *Life Sciences* 1 (1962) 377-80.
- [21] J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems-An Analytical Approach.* Ellis Horwood Limited, England. (1990).
- [22] K.W.W. Chin-Chang Hung, Peter H. Santschi, A seasonal survey of carbohydrates and uronic acids in the Trinity River, Texas. *Organic Geochemistry* 36 (2005) 463-74.
- [23] A. Mannino, H.R Harvey, Biochemical composition of particles and dissolved organic matter along an estuarine gradient: sources and implications for DOM reactivity. *Limnology and Oceanography* 45 (2000) 775-88.
- [24] P.A. Meyers, *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry* by R. A. Larson and E. J. Weber. *Organic Geochemistry* 23 (1995) 95.
- [25] E.M. Thurman, In, Nijhof, M., Junk, D.W. (Eds.), *Organic Geochemistry of Natural Waters* (1985).
- [26] B.Legube, L.Hureiki, J.P.Croué, Chlorination studies of free and combined amino acids. *Water Research* 28 (1994) 2521-31.
- [27] M.Doré, *Chimie des Oxidants et Traitement des Eaux. Technique et Documentation-Lavoisier.* (1989).
- [28] David H Rosenblatt, A Hull Larry, Donald C.DeLuca, Davis George Thomas, R.G.Weglein, H.K.R Williams, Oxidations of Amines. 11. Substituent Effects in Chlorine Dioxide Oxidations. *Journal of the American Chemical Society* 89 (1967) 5.
- [29] M.J.G. Napolitano, J.Brandon, J.S. Nicoson, D.W. Margerum, Chlorine Dioxide Oxidations of Tirosina, N-AcetylTirosina, and Dopa. *Chemical Research in Toxicology* 18 (2005) 501-08.
- [30] K.Taymaz, D.T.Williams, F.F Benoit, Reactions of aqueous chlorine dioxide with amino acids found in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (1979) 456-63.
- [31] I.Noss Charles, H Dennis William., P.Olivieri Vicent, Reactivity of chlorine dioxide with nucleic acids and proteins. *Water Chlorination: Environ. Impact Health Eff.* 4 (1983) 1077-86.
- [32] H.K.Tan, W.B.Wheeler, C.I. Wei, Reaction of chlorine dioxide with amino acids and peptides: kinetics and mutagenicity studies. *Mutation Research* 188 (1987) 259-66.

Capítulo 7. Reacción del dióxido de cloro con tres amino ácidos representativos en agua

- [33] A.C Sen, J. Owusu-Yaw J., W.B.Wheeler, C.I. Wei, Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with tryptophan, N-methyltryptophan, and 3- indolelactic acid: kinetic and mutagenicity studies. *Journal of Food Science* 54 (1989) 1057-60.
- [34] H.Tan, A.C Sen, W.B.Wheeler, J.A.Cornell, C.I. Wei, A kinetic study of the reaction of aqueous chlorine and chlorine dioxide with amino acids, peptides and proteins. *Journal of Food Science* 52 (1987) 1706-11,17.
- [35] R.J. Sundberg, The chemistry of indoles. In *Organic Chemistry, a series of monographs*; Blomquist, A.T., Editor; Academic Press: New York and London. (1970).
- [36] Jerry March, Michael B. Smith, *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure* (6 ed.). (2007).
- [37] A.R, Katrizky, *Advances in Heterocyclic Chemistry*. 83 (2002).
- [38] J.K. Whitesell, MA Fox, *Core organic chemistry*. Jones and Bartlett. Boston. (1997).
- [39] A. Harriman, Further Comments on the Redox Potentials of Tryptophan and Tirosina. *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 6102.
- [40] E. Metcalf, Inc. *Wastewater engineering treatment and reuse*. McGraw-Hill, New York. (2003).
- [41] M. Burke, J. Tenney, B. Indu, M.F. Hoq, S. Carr, W.R. Ernst, Kinetics of hydrogen peroxide-chlorate reaction in the formation of chlorine dioxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 32 (1993) 1449-56.
- [42] USEPA, *Alternative disinfectants and oxidants guidance manual*. EPA-815-R-99-014 (1999).
- [43] D.J. Gates, *The chlorine dioxide handbook (Water disinfection series)*. American water works association (1998).
- [44] 4500-ClO₂-D. (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th Edition.
- [45] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: Product study of the reaction of three b-lactam antibiotics with ClO₂. *Water Research*.42 (2008) 1935-1942.
- [46] W.V.Ligon, H.Grade, Techniques for postcolumn derivatization in gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 63 (1991) 255-61.
- [47] D. Li, J. Park, J.R. Oh, Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination. *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3089-95.
- [48] M.Chakrabarty, K.Shampa, Y. Harigaya, Y.Konda, Neat formic acid: an excellent N-formylating agent for carbazoles, 3-alkylindoles, diphenylamine and moderately weak nucleophilic anilines. *Synthetic Communications* 30 (2000) 187-200.
- [49] M.T.S Yamada: Preparation of 5-hydroxyhydantoin. *Eur. Pat. Appl.* (1991).

Capítulo 8

**Desinfección fotocatalítica de una
agua contaminada con
Cryptosporidium Parvum y *Giardia
Lamblia* empleando un fotocatalizador
cerámico de fibras de TiO_2 .**

8.1 Introducción

La desinfección del agua para asegurar la ausencia de microorganismos patógenos nocivos para la salud humana es uno de los principales objetivos en el tratamiento de aguas ¹⁻³. Entre los diferentes tipos de protozoos relevantes en las pruebas de desinfección del agua destacan el *Cryptosporidium Parvum* (*C.Parvum*) y *Giardia Lambli*a (*G.Lambli*a) debido a que son dos microorganismos notablemente resistentes a la desinfección por cloro ^{1,4}. La radiación UV es un método general para la desinfección del agua ^{5,6}. Sin embargo *C.Parvum* y *G.Lambli*a también son considerablemente resistentes a la luz UV y para estos dos tipos de protozoos se necesita un tiempo de exposición mucho mayor comparado con el necesario para llevar a cabo la desinfección de bacterias aerobias ⁵. Teniendo en cuenta estos precedentes y eligiendo a *C.Parvum* y a *G.Lambli*a como microorganismos de referencia, el objetivo del presente Capítulo es determinar la eficiencia de desinfección de un nuevo fotocatalizador cerámico de TiO₂ soportado sobre sílice.

El TiO₂ es un fotocatalizador ampliamente empleado ⁷ que bajo excitación genera un estado de separación de cargas que consiste en electrones en la banda de conducción y en huecos positivos en la banda de valencia. La energía de los electrones en la banda de conducción corresponde a especies reductoras suaves, pero en cualquier caso capaces de reducir el oxígeno molecular al ión superóxido O₂⁻. Por el contrario, los huecos de la banda de valencia son agentes fuertemente oxidantes capaces de oxidar al agua a radicales hidroxilo (·OH) los cuales son altamente agresivos. Estos radicales ·OH al igual que el ión superóxido y otras especies de oxígeno activas son las responsables de la desinfección en el agua al provocar la muerte de los microorganismos por ataque a las membranas celulares y a las proteínas citoplasmáticas ^{8,9}.

Un problema general del TiO₂ es el diseño del reactor fotoquímico para su operación en flujo continuo ¹⁰. La mayor parte de los trabajos descritos sobre desinfección fotocatalítica se han llevado a cabo para pequeños volúmenes de muestra, condiciones discontinuas ¹¹ y empleando TiO₂ en polvo suspendido en la disolución ^{12,13}. En este contexto, el hecho de emplear TiO₂ en polvo y suspendido en el agua dificulta la operación de flujo continuo por lo que un fotocatalizador de titanio soportado es mucho más adecuado para este propósito. Esta cuestión de cómo disponer el fotocatalizador es particularmente importante, ya que la inmovilización del semiconductor suele producir una disminución en

su eficiencia de desinfección comparada con la obtenida al trabajar con TiO₂ en polvo en continua agitación. Sin embargo, recientemente se han descrito unas fibras de sílice conteniendo óxido de titanio en su superficie que son prometedoras como fotocatalizador en sistemas en continuo porque pueden servir para preparar materiales porosos no tejidos que pueden estar permanentemente expuestos a la luz UV en un reactor fotoquímico sin que tenga lugar la lixiviación de titanio¹⁴. Este material fotocatalítico ha sido descrito y patentado recientemente por UBE Chemicals que ha proporcionado las muestras para la realización del presente estudio. Un flujo continuo de agua podría atravesar este material poroso fotocatalítico, asegurando una actividad fotocatalítica óptima del sistema puesto que se maximiza el contacto entre el agua con el fotocatalizador expuesto a la luz.

En el presente capítulo se presentan los resultados sobre eficiencia de desinfección de un material de fibras de titanio no hilado soportado en sílice¹⁴ para los protozoos *C.Parvum* y *G.Lambli*a. Comparado con los precedentes relacionados con la desinfección fotocatalítica^{12,13} nuestro estudio presenta como aspectos importantes el uso de disoluciones contaminadas preparadas con pocos protozoos y empleando un agua real que contiene concentraciones significativas de carbonato y bicarbonato, sales inorgánicas y materia orgánica disuelta (MOD). Esta situación de un bajo contenido en protozoos y un agua natural con un elevado contenido en sales inorgánicas y MOD determina que las condiciones del estudio se aproximen sean más a las reales en comparación con el empleo de disoluciones empleando agua purificada¹⁵. Los datos obtenidos demuestran que las irradiaciones fotocatalíticas empleando fibras cerámicas de TiO₂ son mucho más eficientes para la desinfección de aguas que sí se emplea exclusivamente radiación UV.

8.2. Desinfección fotocatalítica de *C.Parvum* y *G.Lambli*a

Las pruebas de desinfección fotocatalítica se han realizado contaminando simultáneamente con ooquistes y quistes de *C.Parvum* y *G.Lambli*a, respectivamente, un agua potable previamente declarada (ver procedimiento experimental en el Capítulo 9). Con este tipo de muestras contaminadas se llevaron a cabo cuatro series de pruebas de desinfección empleando: 1) luz UV exclusivamente (lámpara de mercurio de baja presión, 254 nm); 2) luz UV (la misma fuente de antes) y el fotocatalizador de UBE; 3) luz UV y una pequeña concentración de hipoclorito y 4) luz UV (254 nm), el fotocatalizador UBE y una pequeña concentración de hipoclorito. Las razones para llevar a cabo esta serie de experimentos fueron, por una parte, determinar la actividad de ensayos control en ausencia de cualquier fotocatalizador para establecer el porcentaje de desinfección por luz UV que estará superpuesto con el efecto fotocatalítico. Por otra parte, también se pretende establecer si la adición de una pequeña concentración de cloro, típicamente presente en el agua, aumenta la eficiencia del proceso fotocatalítico. Una razón adicional acerca del interés de llevar a cabo el estudio fotocatalítico en presencia de agentes químicos de desinfección es que la mayor parte de las regulaciones sobre calidad del agua obligan a que ésta contenga una concentración mínima de cualquiera de estos agentes de la desinfección, preferiblemente de cloro. También se determinó el valor control de la desinfección en la oscuridad cuando únicamente está presente el agente de la desinfección. Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la actividad fotocatalítica de las muestras contaminadas con *C.Parvum* y *G.Lambli*a se resumen en la Tabla 8.1.

De los resultados presentados en la Tabla 8.1, se deduce que la irradiación UV en ausencia de fotocatalizador es ineficaz para promover en tiempos de irradiación cortos un porcentaje de reducción apreciable en el número de cuentas de los protozoos estudiados. Nuestros resultados están de acuerdo con los datos de la literatura que han descrito la baja eficiencia de la luz UV para promover la desinfección de *C.Parvum* y *G.Lambli*a¹⁹. De hecho como se ha indicado anteriormente se seleccionaron para el presente estudio estos dos protozoos porque se pretende demostrar la actividad del fotocatalizador UBE para la desinfección de dos de los microorganismos más resistentes a los tratamientos comunes de desinfección. Únicamente cuando el tiempo de irradiación fue suficientemente largo (Tabla 8.1, entrada 2), se observó una disminución significativa en la población de los dos protozoos por irradiación con luz UV. Incluso a estos tiempos largos de irradiación, la *G.Lambli*a todavía fue notablemente resistente y alrededor de un 14 % de la población inicial sobrevivió a este tratamiento. Considerando que un aumento en el tiempo de

exposición de la luz UV más de 30 min no haría viable el método de desinfección fotoquímico, no se llevaron a cabo experimentos a tiempos de exposición más largos.

Tabla 8.1. Resultados de la eficiencia de la desinfección para *C.Parvum* y *G.Lamblia* en los diferentes experimentos. Los datos corresponden a la media de dos experimentos los cuales además mostraron resultados similares. Los valores indicados en porcentaje corresponden al porcentaje de desaparición de los microorganismos. Condiciones de irradiación: 500 L h⁻¹; Volumen del sistema = 150 L; Lámpara de mercurio UV (254 nm, 40 W)

	Entrada	Tiempo de irradiación (min)	ClO ⁻ (mg L ⁻¹)	<i>C.Parvum</i> (oocitos/20 L)		<i>G.Lamblia</i> (quistes/20 L)	
				Inicial	Final	Inicial	Final
Irradiaciones UV fotoquímicas en ausencia de fotocatalizador							
	1	14	0	51	40	165	165
				21,5 %		0 %	
	2	30	0	36	1	299	41
				97,2 %		86,2 %	
	3	4,5	0,15	52	51	135	135
				1,92 %		0 %	
Irradiaciones en presencia del fotocatalizador UBE							
	4	10	0	19	4	114	16
				78,9 %		86 %	
	5	18	0	72	1	282	16
				98,6 %		94,3 %	
	6	30	0	29	0	225	11
				100 %		95,1 %	
	7	4,5	0,15	12	4	61	17
				66 %		72 %	
	8	8,5	0,15	21	0	77	0
				100 %		100 %	
Control sin irradiación							
	9	30	0,15	52	52	282	282
				0 %		0 %	

En contraste a la baja eficiencia de la luz UV para llevar a cabo la desinfección completa, la Tabla 8.1 muestra que el proceso fotoquímico implementado con el fotocatalizador UBE es mucho más eficiente. Tal y como podría anticiparse fácilmente, el porcentaje de reducción en el número de cuentas aumenta gradualmente con el tiempo de exposición. Así pues, el porcentaje de reducción de la población de ambos microorganismos empleando luz UV combinada con el fotocatalizador UBE ya es elevado a los 10 min de exposición, siendo casi completa a los 18 min (Tabla 8.1, entrada 5). Particularmente notable es la eficiencia con respecto a la *G.Lamblia* que parece ser el microorganismo más resistente a la luz UV. Tal y como se comentó previamente en los

ensayos correspondientes las irradiaciones con luz UV, tiempos de iluminación mayores de 30 min no fueron considerados en base a la nula viabilidad del proceso a nivel industrial.

Pensando en aplicaciones reales del sistema fotocatalítico y considerando que el agua a tratar debe contener hipoclorito debido a las regulaciones legales vigentes²⁰ fue de interés probar la actividad biocida del fotocatalizador de fibras cerámicas de dióxido de titanio para aguas biológicamente contaminadas que contienen una pequeña cantidad de hipoclorito. La idea fue determinar la influencia de pequeñas concentraciones de cloro que puedan encontrarse habitualmente en las aguas a tratar durante el proceso de desinfección fotocatalítica.

Tal y como puede verse en la Tabla 8.1, se ha encontrado un sinergismo favorable entre el hipoclorito y el proceso fotocatalítico. Así pues, incluso a tiempos de exposición muy cortos (Tabla 8.1, entrada 7), la reducción de la población fue significativa y completa para tiempos de irradiación menores de 9 min (Tabla 8.1, entrada 8). Estos resultados son comparativamente mejores que los obtenidos con el fotocatalizador en ausencia de hipoclorito. Para valorar adecuadamente el resultado anterior, tres puntos merecen ser comentados. El primero de ellos es que se sabe que los protozoos bajo estudio son altamente resistentes a la desinfección únicamente con cloro¹, no observándose actividad biocida alguna en las pequeñas concentraciones de hipoclorito ensayadas tal y como demuestra igualmente nuestro blanco control (Tabla 8.1, entrada 9). El segundo comentario es que un experimento control en el cual se empleó la luz UV para la desinfección de una disolución conteniendo 0,15 mg L⁻¹ de hipoclorito fue notablemente ineficiente para promover una reducción en la población de los dos protozoos. Estos resultados demuestran de nuevo el papel desempeñado por el fotocatalizador de titanio en la desinfección. El tercer comentario se refiere a que las condiciones empleadas en la Tabla 8.1, entradas 7 y 8 son de fácil aplicación en condiciones reales. De hecho, actualmente en el tratamiento común de aguas sospechosas de contener *C.Parvum* y *G.Lamblia* se emplean típicamente elevadas concentraciones de hipoclorito, en el rango de 10 mg L⁻¹. Esta elevada concentración de hipoclorito causa efectos adversos y molestias en los seres humanos en contacto con este tipo de aguas conteniendo concentraciones tan elevadas de hipoclorito. Un ejemplo práctico donde habitualmente se efectúa la sobrecloración son las aguas de las piscinas^{19,20} en las que la hipercloración persigue minimizar los riesgos sanitarios de estas aguas. En estos casos, el uso del sistema fotocatalítico descrito aquí sería de gran utilidad porque permitiría emplear concentraciones muy pequeñas de cloro asegurando al mismo tiempo la ausencia de bacterias y otros microorganismos nocivos.

8.3 Conclusiones

Por consiguiente los resultados presentados demuestran el que el sistema fotocatalítico basado en las fibras cerámicas de TiO_2 es eficiente para la desinfección de *Cryptosporidium Parvum* y *Giardia Lambli*a. Además se ha encontrado un efecto sinérgico entre dicho sistema y la adición de pequeñas cantidades de hipoclorito consiguiéndose una reducción notable en los tiempos de exposición manteniendo la eficiencia de desinfección.

8.4. Referencias bibliográficas

- [1] W.Q. Betancourt, J.B. Rose, Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia, *Vet Parasitol* 126 (2004), 219–234.
- [2] J. Orme, C.S. Mullin, E.V. Ohanian, Health effects of disinfectants and disinfection by-products: a regulatory perspective, *Water Chlorination* 6 (1990) 75-86.
- [3] F.W. Pontius, Regulatory compliance planning to ensure water supply safety, *J. Am. Water Works Assoc.* 94 (2002) 52–64.
- [4] E.W. Rice, J.C.Hoff, F.W. Schaefer, Inactivation of Giardia cysts by chlorine, *App. Environ. Microbiology* 43 (1982) 250-251.
- [5] W.A.M. Hijnen, E.F. Beerendonk, G.J. Medema, Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review, *Water Res* 40 (2006), 3–22.
- [6] K.G. Linden, J. Thurston, R. Schaefer, J.P. Malley, Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps, *App Environ Microbiology* 73 (2007) 7571-7574.
- [7] A. Fujishima A., T.N. Rao, D.A. Tryk, Titanium dioxide photocatalysis, *Photobiol. C Photochem. Rev.* 1 (2000)1-21.
- [8] A.G. Rincón, C. Pulgarin, Photocatalytic inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration, *Appl Catal B: Environ* 44 (2003) 263-284.
- [9] A.G. Rincón, C.Pulgarin C, Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂ implications in solar water disinfection, *Appl Catal B: Environ* 51 (2004) 283-302.
- [10] R.L. Pozzo, M.A. Baltanas, A.E.Cassano, Supported titanium dioxide as photocatalyst in water decontamination. *Catal Today* 39 (1997) 219-231.
- [11] F. Mendez-Hermida, J.A. Castro-Hermida, E. Ares-Mazas, S.C. Kehoe, K.G. McGuigan, Effect of batch-process solar disinfection on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking water, *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 1653-1654.
- [12] H. Ryu, D. Gerrity, J.C. Crittenden, M. Abbaszadegan, Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium Parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation, *Water Res* 42 (2008) 1523-1530.
- [13] M. Sökmen, S.Degerli, A.Aslan, Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water (doi:10.1016/j.exppara.2007.12.014), *Exp Parasitol* 2007.
- [14] I. Toshihiro, Y. Hiroyuki, H. Yoshikatsu, T. Fujii, T. Nagasawa, A general process for in situ formation of functional surface layers on ceramics, *Nature* 416 (2002) 64-66.
- [15] J. Lisle, J. Rose, *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini-review. *J Water SRT-Aqua* 44 (1995) 103-117.
- [16] C.M. Hancock, J.B. Rose, M.Callahan, *Crypto* and *Giardia* in U.S. groundwater, *J Am Water Works Ass* 58 (1998) 58-61.
- [17] Z. Bukhari, H.V. Smith, N. Sykes, S.W. Humphreys, C.A. Paton, R.W.A. Girdwood, C.R. Fricker, Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England, *Water Sci Technol* 35 (1997) 385-390
- [18] US EPA, US EPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/FA, EPA-821-R-99-006 (1999).
- [19] Morita S., Namikoshi A., Hirata T., Oguma K., Katayama H., Ohgaki S., Motoyama N. and Fujiwara M. 2002. Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *App Environ Microbiology* 68:5387-5393.
- [20] EU 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities No. L 330, 05.12.1998, pp. 32–54
- [21] Hamence J. H. 1980. The chlorination of swimming pools and the presence of apparent nitrogen trichloride. *J Assoc of Public Analysts* 18:125-128.
- [22] Scotte P. 1984. Study of halogenated organic compounds in covered swimming pools. *Eau, l'Industrie, les Nuisances* 86:37-41.

Capítulo 9

Procedimiento experimental.

9.1 Materiales

9.1.1. Reactivos químicos

Los siguientes productos han sido suministrados por Sigma-Aldrich: sal potásica de la penicilina G, amoxicilina, cefadroxil, ácido cítrico, ácidos húmicos, resorcinol, gliceraldehído, fructosa, glucosa, maltosa, maltotriosa, maltopentosa, manosa, arabinosa, galactosa, ribosa, ácido ribónico, ácido glicérico, fucosa, talosa, xilosa, lixosa, eritrola, mio-inositol, ácido 2-hidroxibenzoico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido tioacético, ácido 1,4-butanodioico, paracetamol, ácido oxálico, ácido malónico, nicotinamida, sarcosina, ácido altrónico, un conjunto de 21 L aminoácidos, ácido propanodioico, ácido fumárico (ácido trans-butenodioico), ácido maleico (ácido cis-butenodioico), ácido glutárico (ácido pentanodioico) y ácido adípico (ácido hexanodioico), y el reactivo N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida con un 10% de trimetilclorosilano (BSTFA + 10% TMCS). El patrón de calibración de THMs fue suministrado por Supelco. El compuesto tris(p-bromofenil)aminio hexafluoroantimoniato ($\text{TPA}^+ \text{AsF}_6^-$) fue suministrado por Scharlab.

Los siguientes productos han sido de grado analítico: cloruro sódico, bromuro sódico, NaClO (10-13%), tiosulfato sódico, nitrato de cobre, nitrato de magnesio y nitrato cálcico. De igual modo, todos los disolventes empleados han sido de HPLC grado analítico.

Los protozoos *Cryptosporidium Parvum* (10^7 oocitos en 1 mL de un tampón fosfato salino, PBS) y *Giardia Lamblia* (10^6 quistes en 1 mL, PBS) fueron suministrados por BTF Company. Cabe mencionar que las muestras dichos protozoos corresponden a cepas que son inofensivas para la salud humana.

9.1.2. Disoluciones modelo

Las disoluciones modelo empleadas se han preparado empleando agua Mili-Q desionizada. Los valores de pH de las disoluciones acuosas se han ajustado empleando PBS, bicarbonato sódico, HCl y/o NaOH, indicándose en cada caso.

9.1.3. Agua del río Turia

El agua superficial natural empleada ha sido la del río Turia. El punto de muestreo ha sido en el cauce del río a su paso por la localidad de Ribarroja del Turia, situada a escasos kilómetros de la entrada a la planta potabilizadora de "La Presa" (Valencia, España). Los datos analíticos disponibles sobre la composición química del agua del río Turia se indican en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. Datos analíticos y físico-químicos del agua del río Turia ^a

Parámetros físico-químicos		Compuestos no deseados	
Color, mg Pt-Co/l	< 5	mg NO ₃ ⁻ L ⁻¹	22
Turbidez. U.N.F.	5	mgNO ₂ ⁻ L ⁻¹	< 0,02
pH	8,2	mgNH ₄ L ⁻¹	0,1
Conductividad 20 °C, μS cm ⁻¹	1.093	N.Kjeldahl, mg N L ⁻¹	<1
mg Cl ⁻ L ⁻¹	117	Oxidab.KMnO ₄ , mgO ₂ L ⁻¹	3,5
μg Br L ⁻¹	280	Surfactants (L.S), μg/l	< 100
mg SO ₄ ⁻² L ⁻¹	286	Total Fe, μg L ⁻¹	12
mg SiO ₂ L ⁻¹	6,4	Total Mn, μg/l	< 30
mg Ca ⁺² L ⁻¹	145	Total Cu, μg L ⁻¹	10
mg Mg ⁺² L ⁻¹	37	Total Zn, μg L ⁻¹	20
mg Na ⁺ L ⁻¹	72	Phosphorus, P ₂ O ₅ , μg L ⁻¹	65
mg K ⁺ L ⁻¹	3	F ⁻ , μg L ⁻¹	280
Tot.Hardness mg CaCO ₃ L ⁻¹	51.6	Ag ⁺ , μg L ⁻¹	< 1
mg HCO ₃ L ⁻¹	251	Toxic Components	
Total Al, mg L ⁻¹	< 0,01	Pesticides, μg L ⁻¹	< 0,5
Dry Residue at 180 °C, mg L ⁻¹	812	THM, μg L ⁻¹	< 5
DOC, mg L ⁻¹	1,8	PAH, μg L ⁻¹	< 0,2

a. Fuente: Aguas de Valencia, S.A.

9.1.4. Resinas

Las resinas Supelita DAX8 (un polímero basado en un éster acrílico) y Amberlita XAD4 (un copolímero basado en estireno-divinilbenceno) han sido suministradas por Supelco. Estas resinas han sido lavadas exhaustivamente antes de ser usadas. El método de limpieza empleado está basado en un procedimiento estándar ¹ que se basa en lavados con disolventes de diferente polaridad y finalmente con agua Mili-Q hasta que la resina no lixivia materia orgánica detectable (ver apartado 9.2.1).

La resina de intercambio catiónico (Purolite-C100) ha sido suministrada por Purolite International Ltd (España). Antes de su uso, la resina fue lavada exhaustivamente con agua Milli-Q, hasta que no se observó en las aguas de lavado materia orgánica detectable (ver apartado 9.2.1).

9.1.5. Membranas

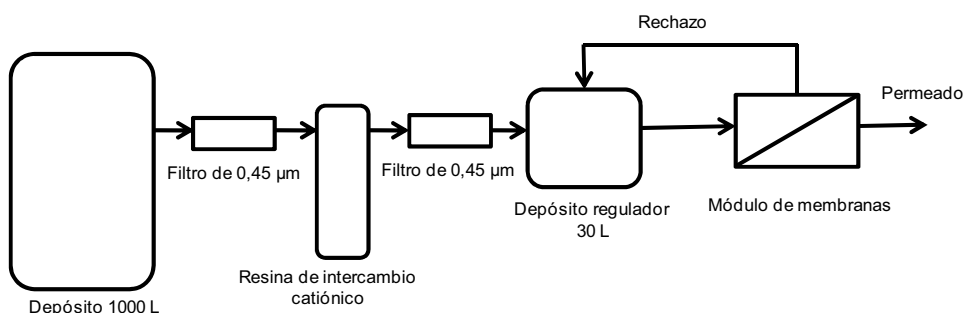
Las membranas de nanofiltración, NF90-2540 y NF270-2540, han sido suministradas por Dow/Filmtec™. Estas membranas son de poliamida y tienen un área activa de 28 m² y un corte molecular de 90 y 270 Da, respectivamente. La membrana de ultrafiltración UF-1,000-XT-B2540 fue suministrada por Filtration Engineering Co. (USA).

Los filtros de nylon (Duofine II, 0,45 µm) fueron suministrados por Pall Corporation.

9.1.6. Planta de nanofiltración

El Esquema 9.1 muestra un diagrama de la planta de membranas empleada para concentrar la materia orgánica disuelta (MOD) del río Turia. Antes de la concentración del agua del río la planta de membranas con todos los componentes instalados se sometió a un procedimiento de limpieza tal y como se describe en el apartado 9.2.2.

El sistema está formado por un depósito de 1.000 L donde se introduce el agua del río Turia. Dicha agua se bombea a través de una resina de intercambio catiónico instalada entre dos filtros de 0.45 µm con objeto de eliminar iones Ca⁺² y Mg⁺² así como materia orgánica particulada. Finalmente el agua se bombea a un depósito de 30 L que actúa de alimentación al módulo de membranas. Dicho módulo trabaja en modo de recirculación donde el permeado se desecha y el rechazo se recircula de nuevo al depósito regulador. De este modo el depósito regulador aumenta constantemente la concentración de materia orgánica disuelta en aquellos componentes que no atraviesan la membrana instalada.



Esquema 9.1. Planta de membranas empleada.

9.1.7. Fotocatalizador de titanio soportado y reactor fotocatalítico

El fotorreactor de flujo continuo conteniendo un fotocatalizador de fibras de titanio soportado ha sido suministrado por UBE Corporation Europe y está comercialmente disponible (<http://www.ube.es>).

Fotocatalizador de titanio

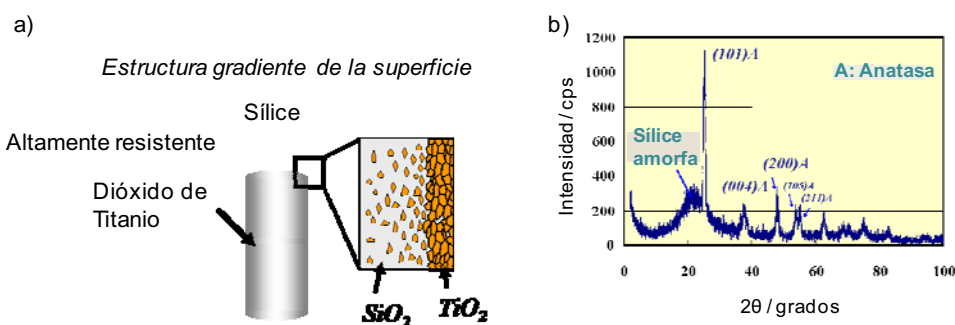
La Figura 9.1a muestra una ilustración gráfica de la estructura del fotocatalizador cerámico fibroso en donde se ha indicado la superficie enriquecida con nanocristales de TiO_2 .

La preparación y características de las fibras de sílice conteniendo titanio han sido descritas por otros investigadores². Básicamente este fotocatalizador se prepara mediante un tratamiento térmico de una mezcla de policarbosilano y butóxido de titanio (50% en peso) a la temperatura de 1.200 °C. En estas condiciones los componentes orgánicos pirolizados dan lugar a la formación de fases de sílice y titanio y a esta temperatura los dominios de titanio debido a su menor densidad migran hacia la superficie de la fibra (ver Figura 9.1a) dando lugar a una lámina funcional enriquecida con titanio de un espesor máximo de 500 nm. Los nanocristales de TiO_2 son predominantemente de fase anatasa (Figura 9.1b). De acuerdo con la difracción de rayos X aplicando la ecuación de Scherrer el tamaño de partícula medio destinado para el TiO_2 fue de 8 nm (Figura 9.1b).

Las fibras fotocatalíticas, de aproximadamente 7 μm de diámetro, pueden comprimirse para formar un material poroso con apariencia de tejido que permite la transferencia de masa de un lado al otro del material fotocatalizador. De este modo la fase expuesta de titanio, fotocatalíticamente activa, es accesible a los sustratos y a los microorganismos presentes en el agua. La característica más importante de estas fibras sin trama textil es la completa ausencia de lixiviación y migración de partículas de titanio de la fibra a la disolución. La ausencia de lixiviación es muy importante para asegurar la estabilidad y durabilidad del fotocatalizador en una corriente continua de agua que puede contener iones y materia orgánica en disolución. La resistencia a la tracción de la fibra es aproximadamente de 2 GPa.

La resistencia mecánica y la dureza de este tejido fotocatalítico conteniendo nanopartículas de TiO_2 permite el diseño de un fotorreactor cilíndrico en el cual se encuentra una lámpara de mercurio de baja presión de 254 nm localizada en el eje del cilindro que ilumina la cara interna de la fibra que contiene el TiO_2 .

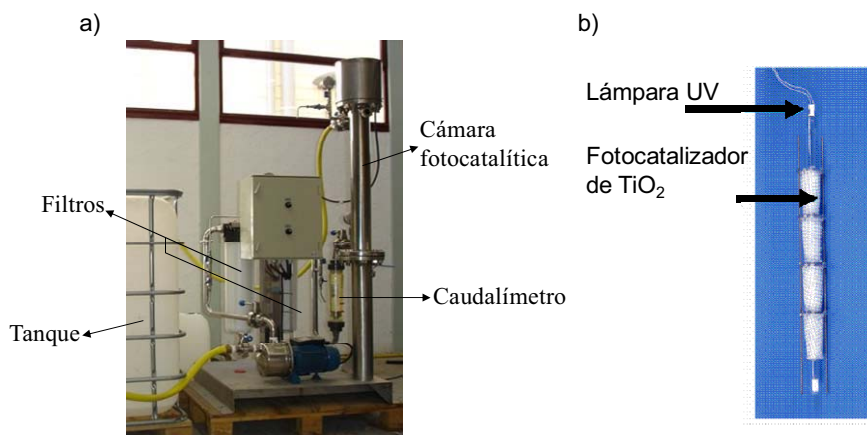
Figura 9.1. a) Dibujos mostrando la estructura heterogénea del fotocatalizador UBE de fibras cerámicas. b) Difracción de Rayos X de la fase de titanio en el fotocatalizador UBE donde se muestra que ésta corresponde a la fase anatasa.



Fotorreactor conteniendo fotocatalizador

El fotorreactor consiste en una lámpara de mercurio de baja presión (765 mm longitud, 254 nm, 10 mW cm⁻²) de 40 W de potencia nominal. La fluencia total de energía que excita al fotocatalizador es de 11,4 W de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Figura 9.2. (a) Fotografía del fotorreactor empleado en este trabajo; (b) Detalle de la lámpara UV y del fotocatalizador dispuesto en conos montados uno a continuación de otro.



El sistema donde está instalado el fotorreactor está diseñado para tener dos filtros (20 y 5 μm, respectivamente) en serie antes de la torre de irradiación (ver Figura 9.2a). Sin

embargo, estos filtros no han sido empleados en los experimentos realizados en la presente Tesis doctoral para evitar la posible retención de los protozoos en los mismos.

En el fotorreactor empleado el agua fluye de la parte central del fotorreactor cilíndrico a la parte externa del cilindro atravesando el fotocatalizador iluminado. La Figura 9.2a muestra una fotografía del sistema empleado. El sistema dispone de un tanque (1.000 L) donde está contenida el agua a tratar y que permite la recirculación de agua a través del fotorreactor. El agua fluye paralela a la lámpara desde abajo hacia arriba del fotorreactor.

El fotocatalizador de UBE en forma de conos truncados (diámetros internos de 50 a 45 cm, 140 mm de longitud) está encajado dentro del fotorreactor de cuarzo alrededor de una lámpara UV (ver Figura 9.2b). Para cubrir la longitud de la lámpara se coloca un conjunto de cuatro conos coaxialmente en el interior del fotorreactor.

9.2 Procedimientos de limpieza de materiales y equipos

9.2.1 Limpieza de las resinas

Las resinas DAX8 y XAD4, antes de emplearlas para el fraccionamiento de la MOD, se han lavado exhaustivamente de acuerdo con el método estándar ¹ hasta que la resina no lixivió materia orgánica detectable por análisis de carbono orgánico. Básicamente, el procedimiento de limpieza consiste, primeramente en la extracción de las resinas con una disolución acuosa básica (0,1 M, NaOH) hasta que el COD del agua filtrada fue menor de 10 mg L⁻¹. En segundo lugar, las resinas se extraen mediante un Soxhlet secuencialmente (24 h para cada disolvente) con metanol, éter dietílico, acetonitrilo y metanol. En tercer lugar, las resinas se lavan con agua Milli-Q hasta quedar libres de metanol; en este momento se mide el COD de las aguas de lavado. El procedimiento de limpieza se repite hasta que en la última etapa no se detecte COD. Finalmente, las resinas se disponen en columnas de vidrio y se lavan con NaOH (0,1 M) y HCl (0,1 M, tres veces para eliminar cualquier impureza debido a la manipulación. La última disolución aplicada es de HCl (0,1 M) con el objetivo de retener eficientemente a pH 2 los adsorbatos presentes en el concentrado.

La resina de intercambio catiónica (Purolite-C100) se coloca en un depósito de plástico provisto de una entrada y una salida. A continuación se lava exhaustivamente mediante una recirculación continua de 50 L de agua destilada a través de la columna a 2 L min⁻¹ durante 1 h. Este procedimiento se repite al menos tres veces. En este momento se toma una muestra de agua y se mide el carbono orgánico total (COT). El procedimiento de limpieza se repite hasta que el COT de la muestra de agua sea inferior al límite de detección del equipo de análisis.

9.2.2. Procedimiento de limpieza de las instalaciones de nanofiltración

El procedimiento que se describe a continuación ha sido aplicado a cada membrana individual NF90-2540, NF270-2540 ó UF-1.000 instalada en la planta de nanofiltración.

Inicialmente todos los componentes (la membrana seleccionada, la resina de intercambio catiónico y los filtros de nylon) se instalan en la planta de nanofiltración. A continuación el depósito regulador de la planta (30 L) se llena con agua destilada. La bomba se conecta para trabajar a un flujo de permeado de 500 L h^{-1} y una presión de 6 bares. De este modo se limpian todos los componentes de la planta simultáneamente. El agua del permeado y del rechazo se recircula al tanque de 30 L durante 1 hora. Pasado este tiempo, se desecha el agua del tanque y se recarga de nuevo con otros 30 L de agua destilada. El procedimiento descrito hasta este punto se repite al menos 3 veces. Posteriormente, se analizan las muestras del permeado y del rechazo, repitiéndose el procedimiento de limpieza de la planta hasta que el COD del permeado y del rechazo sea inferior al límite de detección del equipo de COT.

9.3. Concentración y extracción de la materia orgánica del río Turia

9.3.1 Muestreo y transporte

Para el estudio de la materia orgánica disuelta del río Turia se han muestreado mil litros de agua que fueron bombeados desde el río Turia a un depósito y posteriormente se transportan a las instalaciones universitarias. Inmediatamente al recibir la muestra, ésta se hizo pasar a través de unos filtros de poliéster (Duofine II, $0,45 \mu\text{m}$) para eliminar las partículas en suspensión y los microorganismos. A continuación el agua se hizo pasar a través de una resina de intercambio catiónico (Purolite) para intercambiar por Na^+ los cationes Ca^{+2} y Mg^{+2} , así como otros cationes di- y trivalentes minoritarios y presentes en el agua, a fin de evitar así la precipitación de las correspondientes especies de bicarbonato/carbonato durante la concentración del agua en las instalaciones de nanofiltración. La precipitación de estas sales originaría la obstrucción de la membrana empleada. Después de una etapa adicional de filtración a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$, la muestra descalcificada y filtrada (1.000 L) se sometió a la concentración de la MOD empleando la unidad de nanofiltración.

9.3.2 Etapa de concentración

Después de los procesos de filtración y de ablandamiento del agua, se procedió a la concentración de la materia orgánica disuelta (MOD) en la muestra de agua natural utilizando una unidad nanofiltración operando a 6 bares y un flujo de permeado de 500 L h^{-1} . El proceso se ha repetido con cada una de las 3 membranas objeto de estudio. La planta de nanofiltración opera recirculando continuamente el rechazo de la membrana a un depósito regulador y el permeado que contiene los compuestos orgánicos de masa molecular inferior a 90, 270 ó 1.000 Da en función de la membrana empleada se desecha.

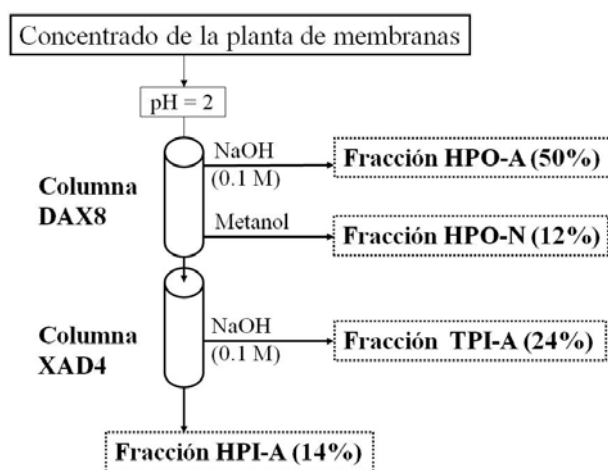
Después de varias horas de operación en ciclo continuo, el volumen inicial (1.000 litros) se redujo a 17 L mientras el contenido en MOD contenido en el agua cruda ($1,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ TOC}$) se concentró a 80 mg L^{-1} , lo cual representa aproximadamente 90% del contenido inicial de carbono orgánico. Cuando se empleó la membrana de corte molecular de 270 Da la materia orgánica disuelta retenida en el concentrado (17 L con $44 \text{ mg L}^{-1} \text{ COD}$) ha sido de un 50% respecto al COD inicial. Este resultado indica que un porcentaje significativo de la materia orgánica en disolución presente en la muestra de agua del río Turia son compuestos de bajo peso molecular y no son retenidos por las membranas cuyo corte de masa es superior a 90 Da .

9.3.3 Fraccionamiento

El procedimiento más ampliamente empleado para el fraccionamiento de compuestos orgánicos disueltos en aguas naturales consiste en el empleo de las resinas poliméricas (DAX8 y XAD4) para retener los componentes orgánicos en función de su naturaleza hidrofóbica/hidrofílica y de sus propiedades ácido/base ¹.

Básicamente el proceso de fraccionamiento consiste en las etapas que se describen a continuación. En primer lugar, el concentrado de nanofiltración acidificado a pH 2 con HCl ($0,1 \text{ M}$) se pasa a través de la resina Supelita DAX8. La desorción de la materia orgánica adsorbida en la Supelita DAX8 se realiza a pH básico con una disolución de NaOH ($0,1 \text{ M}$) en agua Mili-Q; la fracción desorbida se denomina como hidrófoba (HPO-A). Después de la desorción con NaOH, la Supelita DAX8 se lava con metanol para recuperar los adsorbatos que no eluyen con la disolución acuosa de NaOH. La fracción retenida en la resina DAX8 y recuperada con MeOH se denomina como neutra (HPO-N) según la terminología empleada por Malcolm y Thurman ¹. El efluente de la resina DAX8 que contiene los compuestos que no son retenidos en esta columna se pasan posteriormente a través de la resina Amberlita XAD4. El efluente de la resina XAD4 se denomina como hidrofílico (HPI-A). El adsorbato en la Amberlita XAD4 se desorbe con una disolución básica

(NaOH, 0,1 M) en agua Mili-Q y constituye la fracción denominada transfílica (TPI-A). El Esquema 9.2 ilustra el procedimiento de adsorción-desorcción, las resinas empleadas, la nomenclatura de las fracciones obtenidas y el porcentaje de las mismas en términos de TOC.



Esquema 9.2. Procedimiento de fraccionamiento empleado con el concentrado de agua del río Turia.

La fracción HPO-N inicialmente disuelta en metanol se concentra a vacío a 40 °C y el residuo obtenido se redissuelve en agua Mili-Q. Todas las fracciones en disolución acuosa se acidifican a pH 2 con HCl (0,1 M) y se ponen en contacto con la resina de intercambio aniónica IRN-78 con objeto de intercambiar por OH^- los aniones (principalmente HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- y NO_3^-) que interfieren en la subsiguiente caracterización de los compuestos orgánicos. Después de eliminar los aniones inorgánicos, la suspensión de la resina IRN-78, en las disoluciones acuosas conteniendo las diferentes fracciones, se filtra y la disolución acuosa se concentra a vacío a 40 °C y finalmente se liofiliza.

9.4 Reacción de compuestos modelo con Cl_2 y ClO_2

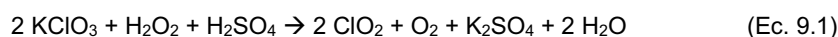
9.4.1 Disoluciones patrón de Cl_2 y ClO_2

El agente de cloración empleado ha sido el hipoclorito sódico (13%). Antes de cada cloración esta disolución se valora y a continuación se prepara una disolución patrón de 1 g L^{-1} . Esta disolución, tras ajuste del pH al valor requerido es la que se emplea para llevar a cabo las cloraciones que se describen a continuación.

El ClO_2 empleado en los diferentes ensayos que se describen a continuación se genera *in situ* siguiendo métodos descritos en la bibliografía ³. Concretamente, el ClO_2 se genera por reducción de clorato potásico con peróxido de hidrógeno en medio ácido según

la ecuación 9.1³. La generación de ClO₂ se realiza agitando en un matraz a 60 °C una mezcla de KClO₃ (5 g), H₂O₂ (4 ml, 33% en agua) y H₂SO₄ concentrado (4,5 ml, 50% en agua). El ClO₂ generado como gas en la reacción se recoge en agua y la disolución resultante de ClO₂ se valora determinando la absorción óptica (espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 35) de la disolución a 360 nm ($\epsilon_{360} = 1.250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) después de haber sido tamponada a pH 7 con NaHCO₃ (1 M). En la producción del ClO₂ se controla la ausencia de una concentración significativa de cloro mediante valoración de dicha disolución antes y después la adición de glicina la cual es un reactivo selectivo para el cloro. La disolución patrón de ClO₂ se ajusta a una concentración de 500 mg L⁻¹.

El ClO₂ es un compuesto altamente tóxico y químicamente inestable que debe ser manejado con extrema precaución. La reacción debe llevarse a cabo en campanas de extracción de humos y empleando en todo momento guantes y gafas de seguridad. Además se debe evitar en todo momento respirar los vapores de ClO₂.



9.4.2 Cloración de disoluciones acuosas de compuestos modelo

Carbohidratos como precursores de THMs

Los experimentos para evaluar el impacto de la cloración en la formación de THMs a partir de carbohidratos, así como a partir de fenol y resorcinol (compuestos modelos tradicionales que generan elevadas concentraciones de THMs), se han llevado a cabo por triplicado para finalmente promediar los resultados obtenidos. La dispersión de los valores en el trio de ensayos fue inferior al 15%.

Las condiciones de cloración y de formación de THMs han sido las siguientes: 2 mg L⁻¹ de carbono orgánico disuelto (COD) de cada sustrato, 10 mg L⁻¹ (143 μM) de cloro libre, 20 °C. La concentración de THMs se determinó a las 72 h cuando se mide el potencial de formación de THMs (PFTHMs) y a diferentes tiempos hasta 400 h para los experimentos cinéticos. El COD de las disoluciones modelo se ha determinado con la fórmula molecular de cada sustrato y el porcentaje de carbono en su estructura. Por ejemplo, para preparar una disolución de 2 mg L⁻¹ de COD de glucosa se requieren 2 mg_C L⁻¹ (12·número_de_carbonos/peso_molecular). Así pues, para la glucosa (C₆H₆O₁₂), la masa de glucosa debe ser: 2/0,4 = 5 mg L⁻¹.

Las disoluciones de fenol, resorcinol y carbohidratos a la concentración de 2 mg L⁻¹ de COD se han preparado a partir de disoluciones que contienen 10 mg L⁻¹ de cada sustrato y se diluyen posteriormente hasta conseguir la concentración requerida.

Las concentraciones de Br^- (a partir de NaBr) son de 50, 100 y 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los ensayos del PFTHMs y de 100, 300, 600 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los experimentos cinéticos (para la velocidad inicial de reacción). Las concentraciones de Cl^- (ReagentPlus NaCl, Aldrich) empleadas son 100 y 200 mg L^{-1} . Hay que tener en cuenta que el NaCl comercial empleado contiene una cantidad mínima de NaBr que junto con impurezas de BrO^- en la disolución de ClO^- es responsable de la observación de un 5-7% de CHBrCl_2 respecto al CHCl_3 . Las muestras de agua se han clorado para tener inicialmente 10 mg L^{-1} de ClO^- . Tras la adición de hipoclorito las botellas (con tapones de rosca) se tapan y almacenan en la oscuridad a 20 °C durante 72 h. Este procedimiento sigue el método estándar para el PFTHMs ⁴.

Las disoluciones se han tamponado al pH requerido empleando tampones fosfato. Los tampones de fosfato se han preparado para tener una concentración de 0,1 M y posteriormente se han añadido alícuotas de estos tampones a la reacción para obtener una concentración final de tampón 10 mM. En este sentido, el pH 11 se fija empleando K_2HPO_4 (0,1 M) y ajustando el pH con K_3PO_4 concentrado. Del mismo modo, pH 8 se fija empleando K_2HPO_4 0.1 M y ajustando el pH con H_3PO_4 ; pH 5 se fija empleando KH_2PO_4 0,1 M y ajustando el pH con K_3PO_4 . Al tiempo requerido, la cloración se detiene, reduciendo el cloro residual contenido en 10 mL de muestra con 0,1 g de tiosulfato, añadiendo además 0,1 g de NaCl para aumentar la fuerza iónica de la disolución y favorecer la presencia de THMs en fase vapor. El cloro libre se ha determinado por el método de la N,N'-dietilfenilendiamina (DPD) (ISO 7393-2:1985). La determinación de THMs se realiza tal y como se indica en el apartado 9.6.7.

Ca⁺² y Mg⁺² como promotores de THMs

Los experimentos para evaluar el impacto en la formación de THMs de la presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} , así como el ión Cu^{+2} como metal de referencia, tras la cloración de disoluciones modelo y del agua natural del río Turia se han llevado a cabo al menos por triplicado para finalmente promediar los resultados obtenidos. Los valores individuales en el trio de ensayos presentan una variación inferior al 15%.

La metodología seguida se describe a continuación. En primer lugar se prepara 1 L de una disolución patrón de 2 mg L^{-1} de COD del correspondiente sustrato (ver Capítulo 5) en agua Milli-Q. El pH de las disoluciones se ajusta a 7.0 empleando una disolución acuosa de NaHCO_3 (0.1 M) y midiendo continuamente el valor de pH con un pH-metro (Metrohm). Una vez que el valor de pH es constante, se toman alícuotas de 100 mL de esta disolución

y se añade a las mismas el volumen correspondiente de las sales alcalino térreas o de nitrato de cobre a partir de unas disoluciones concentradas. Después de la adición de la sal correspondiente, se comprueba que no hay cambios de pH para ninguna de las muestras preparadas, estando el valor de pH a 7,0. La disolución se deja equilibrar durante 3 h antes de añadir 1 mL de una disolución de NaClO de 1 g L⁻¹. A partir de este momento el pH de las disoluciones cambia a 7.8 y este valor se mantiene constante durante todo el tiempo de cloración. Una vez las disoluciones han sido cloradas se sellan y almacenan en la oscuridad a 20 °C durante el tiempo apropiado para determinar las cinéticas de formación de THMs. La comparación para todos los sustratos se realiza empleando los datos medidos a 72 h. Después de este tiempo, la reacción se detiene reduciendo el cloro residual con un exceso de 0,1 g de tiosulfato sódico, y se añade 0,1 g de NaCl para aumentar la fuerza iónica de la disolución.

9.4.3. Reacción del ClO₂ con compuestos modelo en disolución acuosa

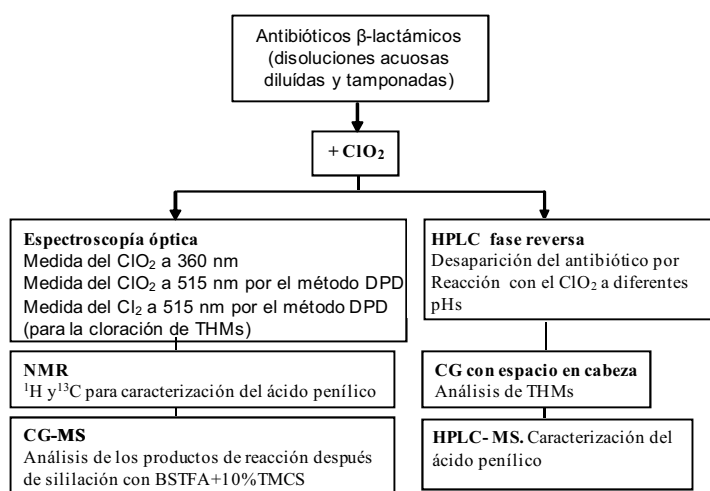
Reacción de antibióticos β-lactámicos con ClO₂

Condiciones generales de reacción

En el Capítulo 6 se estudia la reactividad de tres antibióticos con estructura β-lactámica (comercialmente disponibles), como modelos de contaminantes emergentes en las aguas, frente al ClO₂. Las reacciones se han llevado a cabo en agua tamponada (pH 7; HCO₃⁻/HCl), con la temperatura termostatazada (20 °C) conteniendo 25 (PEN), 1,6 (AMO) y 1,89 mg L⁻¹ (CEF) de los antibióticos. Aunque estas concentraciones son considerablemente mayores a las que son esperables en los recursos hídricos (0,1 mg L⁻¹)²⁰ se ha intentado mantenerlas tan bajas como sea posible pero dentro del límite de detección de la cromatografía líquida. Las reacciones se han llevado a cabo en triplicado y los resultados mostrados corresponden a la media de los ensayos individuales. En general, las variaciones respecto a los ensayos individuales son inferiores al 5%.

A dichas disoluciones acuosas de antibióticos se han añadido los volúmenes adecuados de la disolución patrón de ClO₂ previamente preparada (ver punto 9.4.1) controlando la razón molar ClO₂_inicial/ sustrato al valor requerido (entre 0.1 y 3). El transcurso de la reacción se ha seguido determinando la concentración de ClO₂ mediante espectroscopía óptica (PEN) o valoración colorimétrica con DPD (AMO y CEF). Esta diferencia en el método analítico para determinar el ClO₂ se debe a la absorción a 360 nm los productos de reacción derivados de AMO y CEF que impiden la medida directa de la absorbancia a 360 nm. Al igual que la concentración de ClO₂, la concentración de

antibiótico se ha determinado en los tres casos por análisis de la disolución acuosa mediante la técnica de HPLC en fase reversa. Al final del tiempo requerido el crudo de reacción se ha concentrado a vacío a 40 °C y posteriormente se ha sometido a una siliación exhaustiva empleando una mezcla de BSTFA + 10% TMCS a 80 °C antes de analizar los productos por CG-MS (ver punto 9.6.6). El Esquema 9.3 ilustra el protocolo para llevar a cabo la reacción del ClO₂ con los antibióticos β-lactámicos.



Esquema 9.3. Procedimiento para el análisis de los productos de reacción derivados del tratamiento de los antibióticos con el ClO₂.

Para determinar la estequiometría de la reacción, y conocer si cantidades catalíticas de ClO₂ pueden degradar el antibiótico de manera significativa se han ensayado varias relaciones molares ClO₂ / sustrato. Por otra parte, algunos experimentos se han realizado a propósito, a pHs ácidos ó básicos, para determinar la influencia de este parámetro la reacción y la desaparición espontánea en dicho medio del ClO₂. Se sabe que el ClO₂ es un agente de desinfección que presenta una baja persistencia en agua ^{5,6}. Además, la estabilidad de las disoluciones de ClO₂ depende fuertemente del pH y, por lo tanto, podría suceder que la desaparición del ClO₂ no esté asociada a la reacción con el antibiótico β-lactámico.

Identificación de productos derivados de antibióticos

Antes del análisis de los productos de degradación formados a partir de los antibióticos β -lactámicos, la reacción se detuvo mediante la adición de un exceso de tiosulfato sódico en exceso respecto al ClO_2 . La concentración de antibiótico se ha determinado mediante la técnica de HPLC en fase reversa (ver apartado 9.6.5) trabajando en condiciones isocráticas. La PEN (25 mg L^{-1}) se ha analizado empleando como fase móvil 20% de acetonitrilo y 80% de agua (pH 3; 1% ácido acético). En el caso de AMO ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$) y CEF ($1,89 \text{ mg L}^{-1}$) la fase móvil es 10% de metanol y 90% de agua (pH 4,8; $0,02 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$). En ambos casos el flujo en columna es de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ y el volumen de inyección $200 \mu\text{L}$. El límite de detección depende de la absorbancia de cada antibiótico a la longitud de onda observada (PEN 225 nm y AMO y CEF 229 nm). Los límites de detección de los antibióticos PEN, AMO y CEF bajo las condiciones anteriores son de 5, 0,5 y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente. La identificación de productos se ha basado en: 1) el espectro de masas (ver abajo) de los compuestos derivatizados tras sililación de la mezcla de reacción; 2) en el espectro de masas del producto sililado y su comparación en una muestra auténtica (hidroquinona) tras sililarla comparando el tiempo de retención y el espectro de masas; 3) en la síntesis alternativa de productos de reacción (ver abajo).

Además, en el caso del ácido penílico, la identificación se ha confirmado por comparación de los datos espectroscópicos con una muestra auténtica preparada por hidrólisis ácida de PEN. La comparación entre la muestra auténtica de ácido penílico y el producto de reacción de PEN con ClO_2 se ha basado en el tiempo de retención en el cromatógrafo de gases y los espectros de RMN de ^1H - y ^{13}C , así como los espectros ESI-MS (Figuras 9.3-9.5). La transformación de PEN en el ácido penílico está descrita en la literatura ⁷.

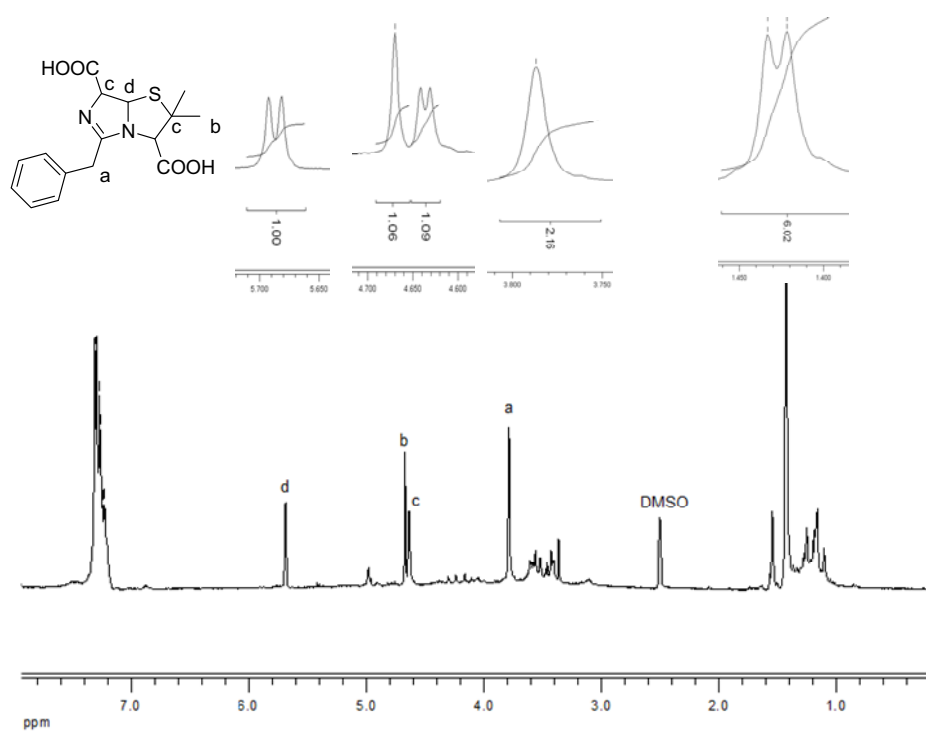


Figura 9.3. Espectro de RMN-¹H del ácido penílico (DMSO-d₆ como disolvente).

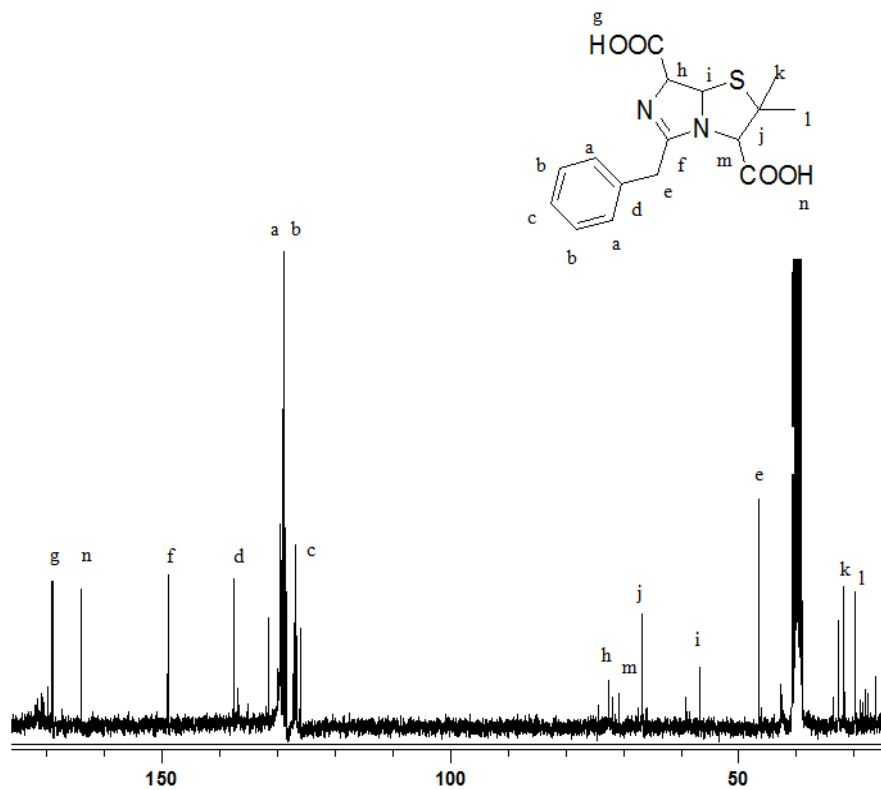


Figura 9.4. Espectro de RMN- ^{13}C del ácido penílico (DMSO-d $_6$ como disolvente).

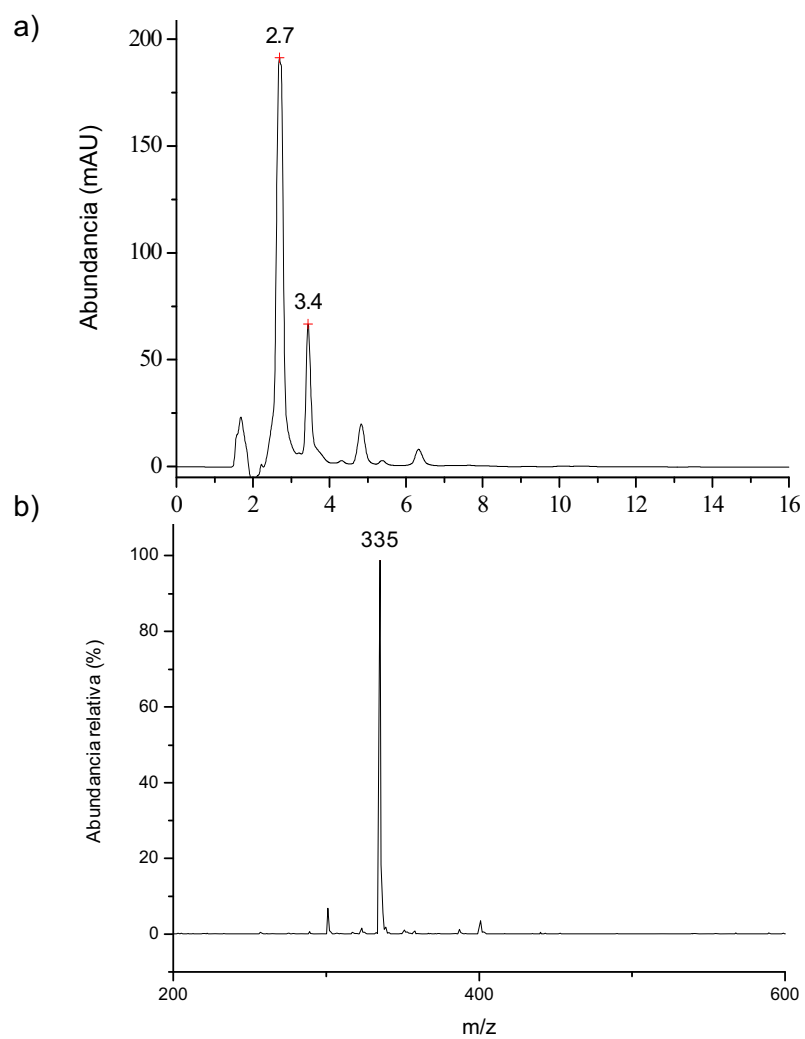


Figura 9.5. a) Cromatograma de HPLC de la reacción de PEN con ClO_2 a pH 3,5, y b) espectro de masas del ácido penilico correspondiente al tiempo de retención 2,7 min.

Síntesis de N-(2-fenilacetil)-glicina

El compuesto N-(2-fenilacetil)-glicina se ha identificado llevando a cabo una síntesis alternativa ⁸ de este producto por reacción de la glicina y el cloruro de fenilacetilo (ver Figura 9.6) y comparando posteriormente el tiempo de retención y su espectro de masas del producto sintetizado con el del producto de reacción de la penicilina con ClO₂.

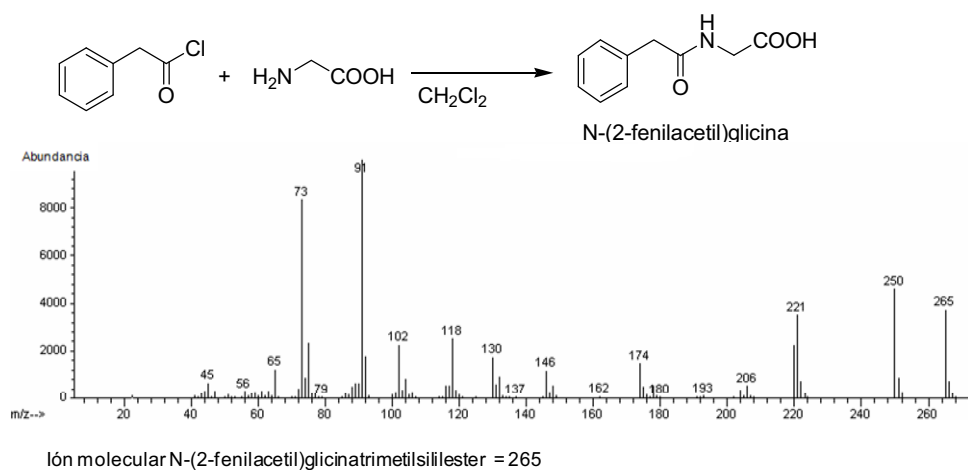


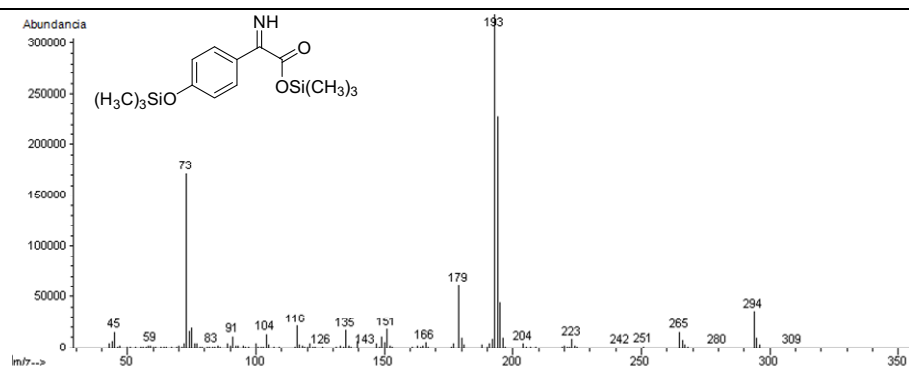
Figura 9.6. Ruta sintética para la preparación del compuesto: N-(2-fenilacetil)glicina ¹⁹.

Los espectros de masas de los productos sililados derivados de la reacción del ClO₂ con antibióticos se muestran a continuación (Tabla 9.2).

Tabla 9.2. Espectros de masas y estructuras propuestas de algunos compuestos de reacción de los antibióticos con ClO₂.

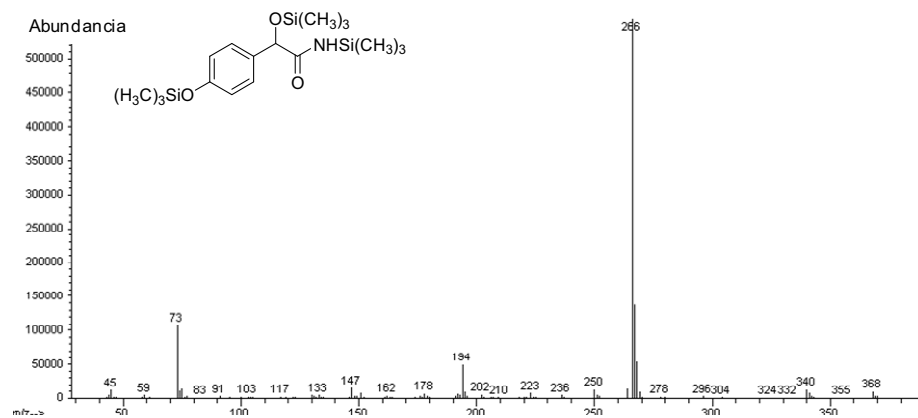
Detectado en el caso de AMO

Capítulo 9. Procedimiento experimental



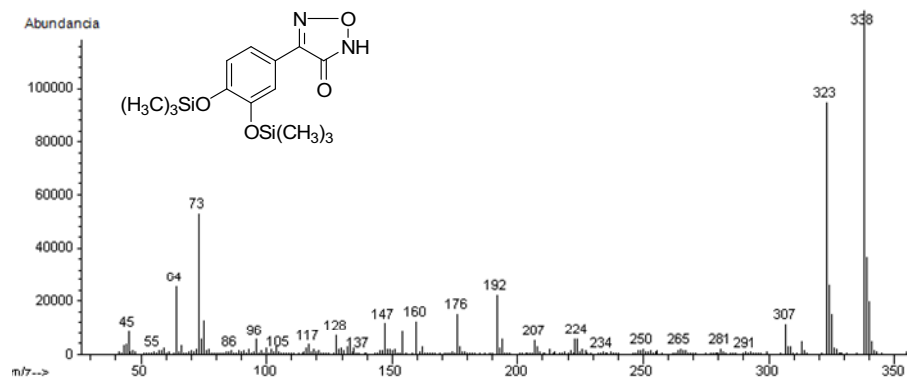
ión molecular=309

Detectado en el caso de AMO



ión molecular=383

Detectado en el caso de AMO y CEF



ión molecular=338

Reacción del ClO₂ con tres amino ácidos representativos en agua

Condiciones generales de reacción

Un punto previo de gran importancia en el presente estudio es establecer unas condiciones experimentales adecuadas y la relación molar sustrato a ClO₂ que puedan ser posteriormente relevantes con las que se emplean en las plantas de potabilización. Obviamente todas las reacciones se han llevado a cabo en agua a temperatura ambiente bajo continua agitación, empleando concentraciones de amino ácidos de 10 mg L⁻¹ y una relación molar sustrato a ClO₂ entre 10 y 0,25. De esta manera, se ha empleado la mínima concentración de amino ácido en el agua sintética que permite la caracterización de productos con las técnicas de HPLC disponibles. Por otro lado, la concentración de ClO₂ requerido en los ensayos para reaccionar con los amino ácidos está ligeramente por encima de la concentración que se emplea industrialmente en la potabilización de aguas (1,4 mg L⁻¹ como máximo)^{42,43}. Además el tiempo de contacto está limitado al tiempo de tratamiento más comúnmente empleado que es típicamente de unas pocas horas.

Después de la valoración del ClO₂ a pH 7, los experimentos se han llevado a cabo bien tamponados a pH 7,5 con CO₂/HCO₃⁻ (10 mM) o sin tamponar, en cuyo caso el pH típicamente decrece de 6 a 4 unidades durante del curso de la reacción. Algunos experimentos se han realizado en ausencia de tampón para prevenir que el tampón carbonato influya en la distribución de productos. En unos ensayos, algunas reacciones se han llevado a cabo en presencia de oxígeno trabajando con atmósfera abierta para permitir la formación de compuestos oxigenados. Los ensayos se han realizado en ausencia de oxígeno empleando la misma concentración de sustrato (10 mg L⁻¹). Las disoluciones libres de oxígeno se han preparado purgando las mismas con una corriente de Ar (45 min) antes de la reacción y llevando a cabo el tratamiento en un matraz cerrado. En estos casos, la disolución no se ha concentrado con el rotavapor sino que se somete inmediatamente a liofilización para asegurar la ausencia de oxígeno durante la manipulación. En algunos casos la disolución resultante es coloreada y la presencia o ausencia de ClO₂ no puede determinarse directamente por espectroscopía óptica. En estos casos, la presencia del ClO₂ se ha detectado por la prueba positiva empleando DPD (N, N'-dietil-1,4-fenilendiamina) como indicador (ISO 7393-2:1985). Para aquellas reacciones en las que el ClO₂ no reacciona completamente al tiempo final de reacción, la reacción se ha detenido añadiendo tiosulfato sódico (50 mg) hasta que la disolución no da la prueba positiva empleando DPP como indicador.

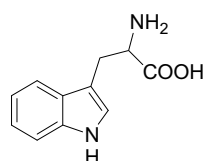
Identificación de compuestos

La identificación de productos se ha basado en el espectro de masas de cada compuesto. Cuando las estructuras propuestas están disponibles en la base de datos de la librería de masas (NIST98), se indica el nivel de coincidencia entre el espectro de masas del compuesto y el espectro de masas de la base de datos. En otros casos, cuando están comercialmente disponibles, se realiza una comparación del tiempo de retención en el CG y el espectro de masas de la estructura propuesta con muestras auténticas de estos compuestos.

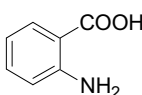
Los compuestos que han sido caracterizados por comparación del tiempo de retención y el espectro de masas con muestras auténticas se encuentran en la Tabla 9.3. Además, los compuestos 5-hidroxi- 2,4-imidazolidinadiona y el ácido N-formilntranílico se han sintetizado por rutas alternativas^{9, 10} (Tabla 9.4) para comparar su tiempo de retención y el espectro de masas de sus derivados trimetilsililos con los datos de la mezcla de reacción. La identificación de los otros productos se ha basado únicamente en el espectro de masas de los derivados sililados y éstos también están enumerados en las Tablas 9.5-9.7.

Tabla 9.3. Productos que han sido identificados por comparación del tiempo de retención en el CG y el espectro de masas con muestras auténticas.

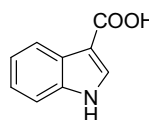
Patrones para el Triptófano



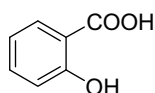
triptófano



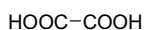
ácido antranílico



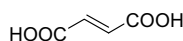
ácido 3-indol
carboxílico



ácido salicílico

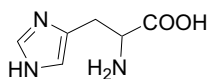


ácido oxálico

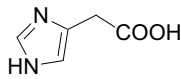


ácido fumárico

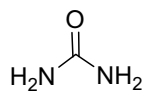
Patrones para la Histidina



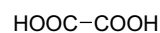
histidina



ácido imidazol
acético

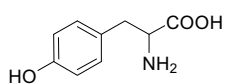


urea

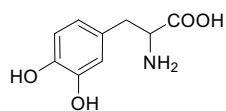


ácido oxálico

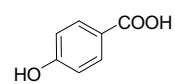
Patrones para la Tirosina



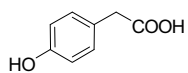
tirosina



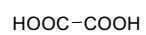
L-DOPA



ácido 4-hidroxibenzoico



ácido 2-(4-hidroxifenil)acético

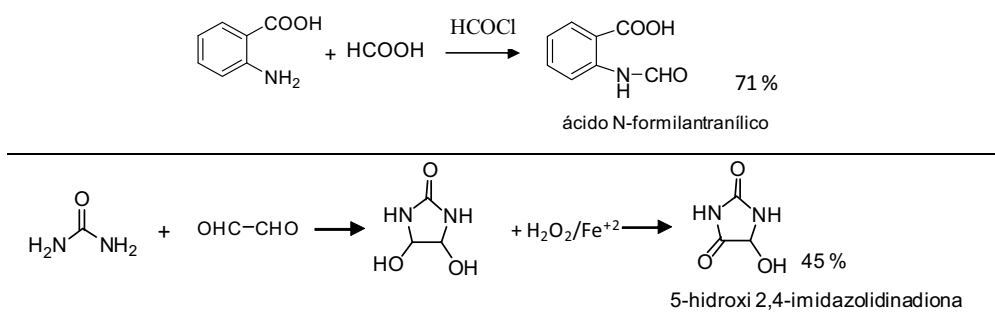


ácido oxálico

Síntesis del ácido N-formilantranílico y de la 5-hidroxi-2,4-imidazolidinadiona

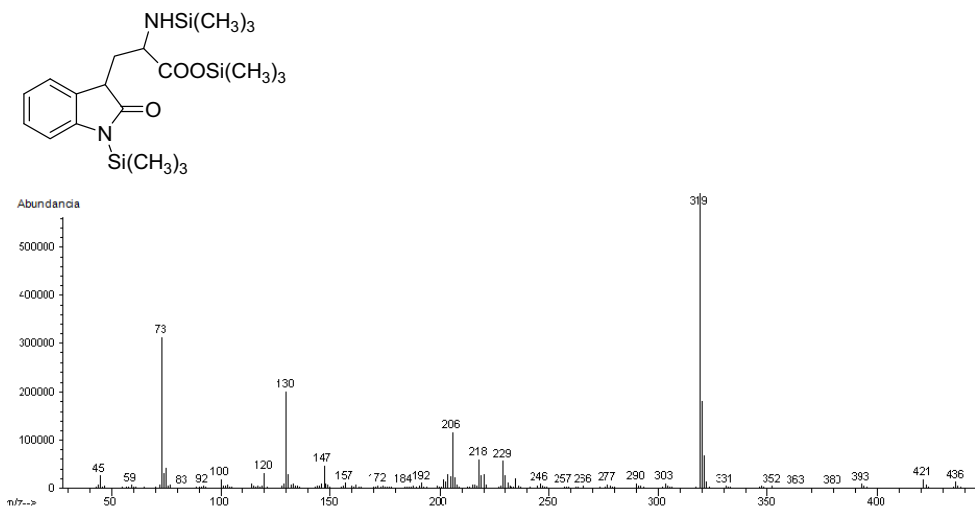
Como se ha comentado, la Tabla 9.4 muestra los productos identificados en la reacción de la histidina y el triptófano con el ClO_2 por comparación del tiempo de retención en el CG y su espectro de masas con compuestos sintéticos que han sido sometidos a sililación con BSTFA. Las rutas sintéticas seguidas para preparar el ácido N-formilantranílico⁹ y la 5-hidroxi 2,4-imidazolidinadiona¹⁰ se han indicado igualmente en la Tabla 9.4 y están basadas en procedimientos publicados.

Tabla 9.4. Síntesis alternativa del ácido N-formilantranílico y la 5-hidroxi-2,4-imidazolidinadiona.



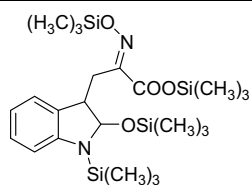
Espectros de masas de algunos productos de reacción del ClO₂ con triptófano, histidina y tirosina.

Tabla 9.5. Espectros de masas de los derivados sililados de los productos de reacción identificados del triptófano con ClO₂.

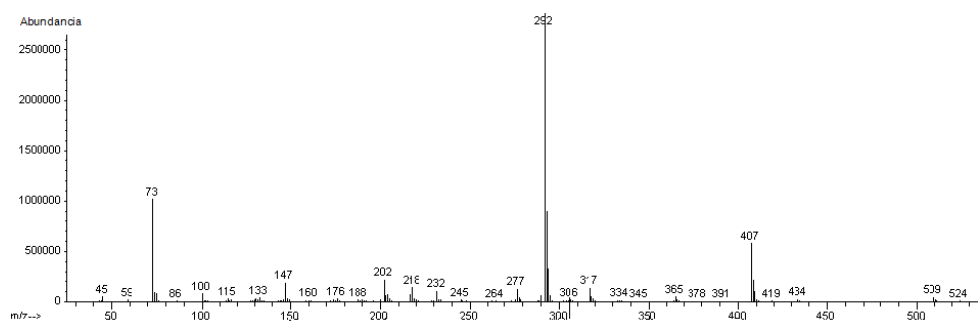


Ión molecular = 436

3-(1-(trimetilsililo)-2-oxoindolina-3-il)-2-(trimetilsililamino)propanoato de trimetilsililo

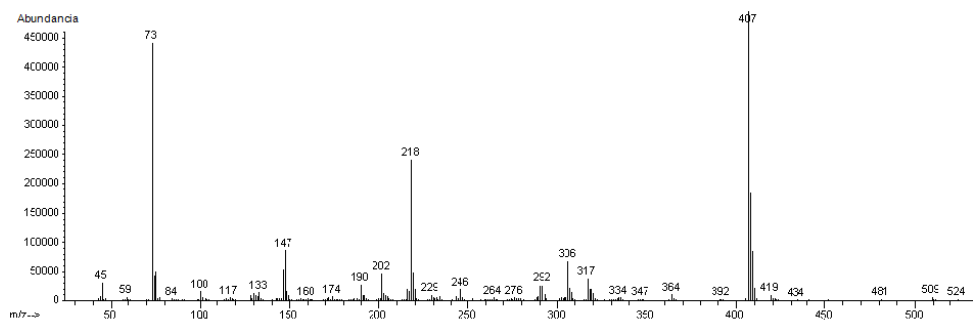
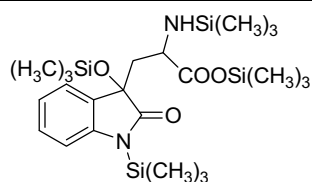


Mezcla de estereoisómeros



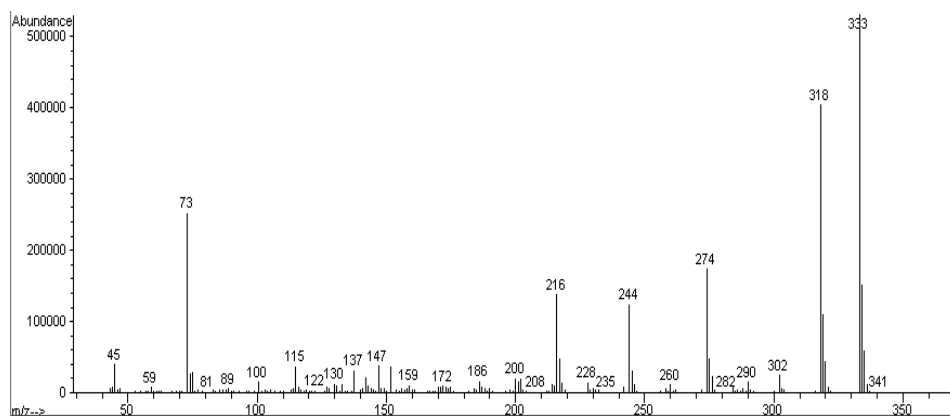
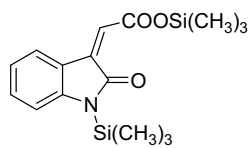
Ión molecular = 524

3-(1-(trimetilsililo)-2-(trimetilsililo)indolina-3-il)-2-(trimetilsil(imina))propanoato de trimetilsililo



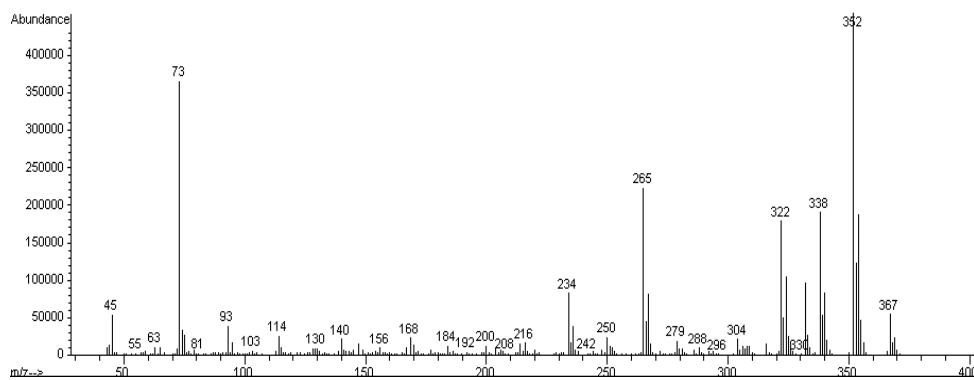
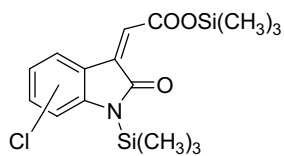
Ión molecular = 524

3-(1-(trimetilsililo)-2-oxo-3-(trimetilsililo)indolina-3-il)-2-trimetilsil(amino)propanoato de trimetilsililo



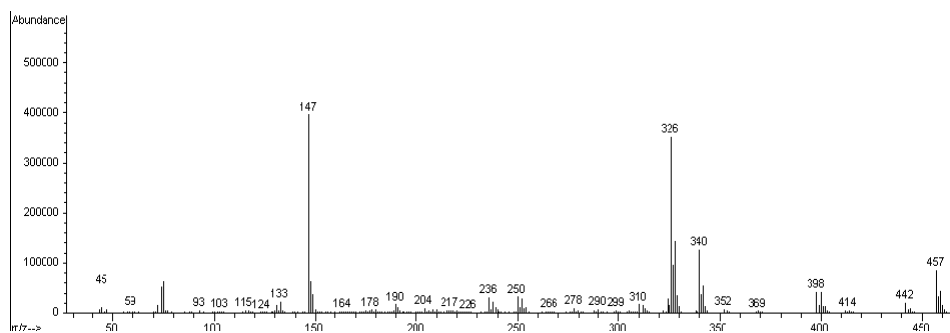
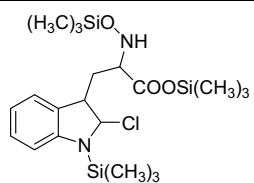
Íon molecular = 333

(Z) 2-(1-(trimetilsilil)-2-oxoindolina-3-iliden)acetato de trimetilsililo



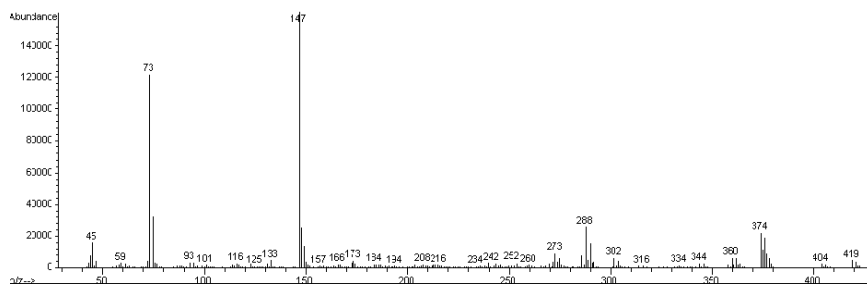
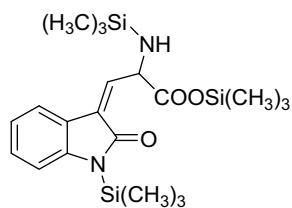
Íon molecular = 367

Derivado clorado del (Z) 2-(1-(trimetilsilil)-2-oxoindolina-3-iliden)acetato de trimetilsililo



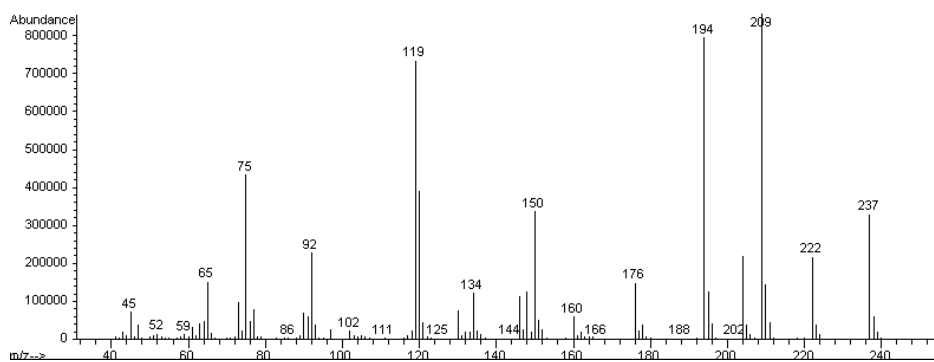
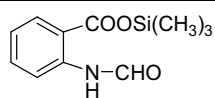
Ión molecular = 472

3-(1-(trimetilsilil)-2-cloroindolin-3-il)-2-(trimetilsililoxiamino)propanoato de trimetilsililo



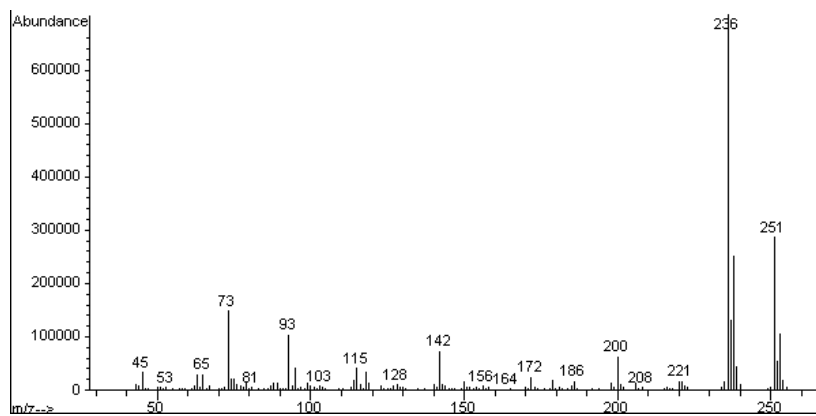
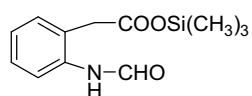
Ión molecular = 434

(Z)-3-(1-(trimetilsilil)-2-oxoindolin-3-iliden)-2-(trimetilsililamino)propanoato de trimetilsililo



Íón molecular = 237

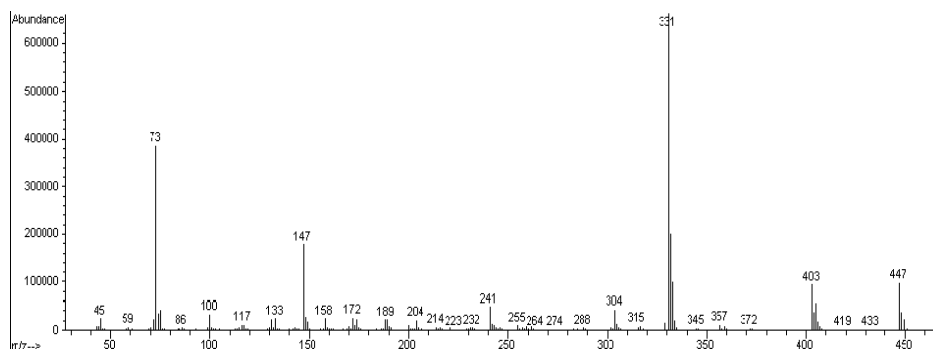
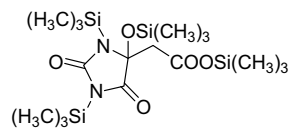
Trimetilsilil N-formilantranilato



Íón molecular = 251

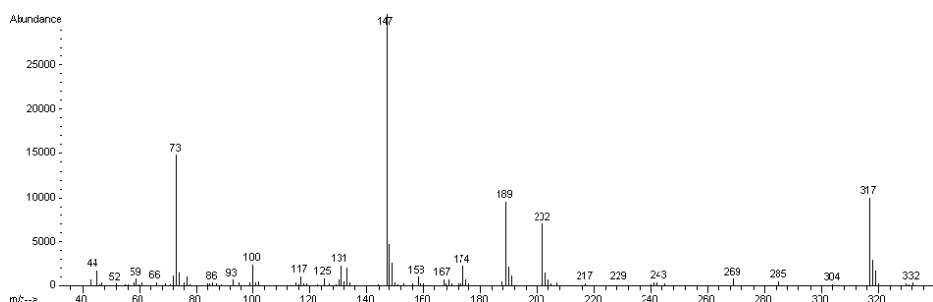
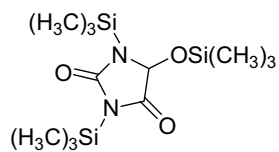
2-(N-formilaminofenil)acetato de trimetilsililo

Tabla 9.6. Espectros de masas de los derivados sililados de los productos de reacción identificados de la histidina con ClO₂.



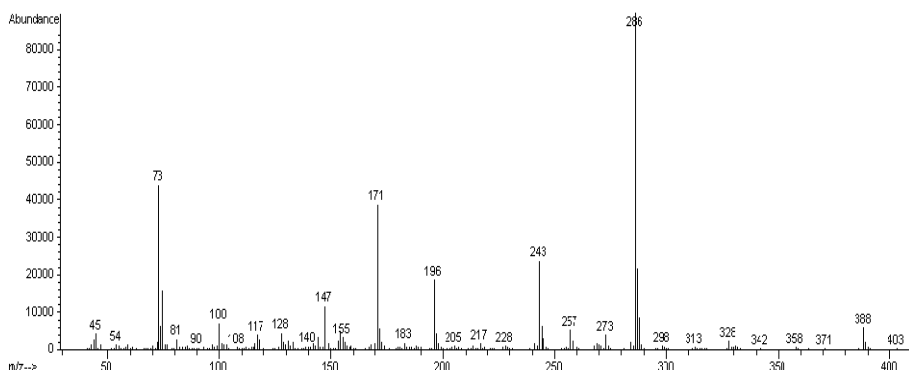
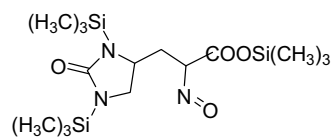
Íón molecular = 462

1,3-(bistrimetilsilil)-trimetilsililoxi-2,4-oxoimidazol-5-il)acetato de trimetilsililo



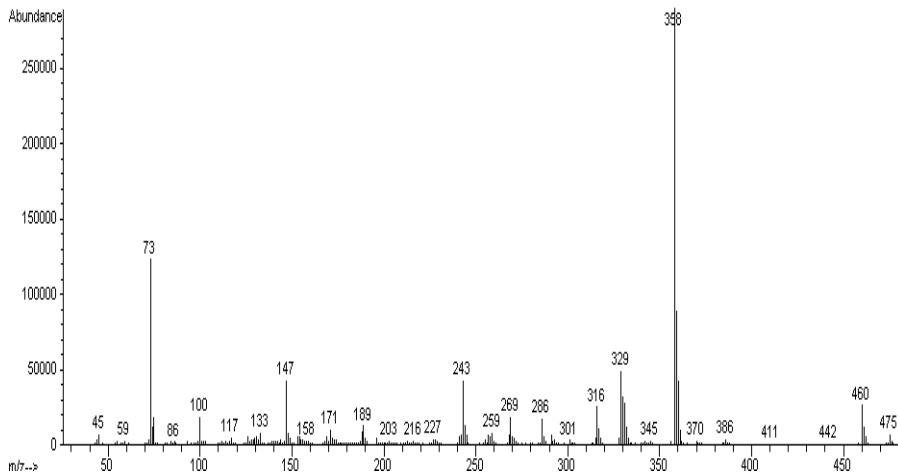
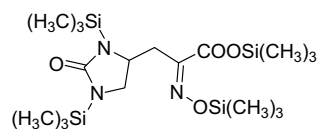
Íón molecular = 332

1,3-Bis(trimetilsilil)-5-trimetilsililoxi-2,4-imidazol-2,4-diona



Íon molecular = 403

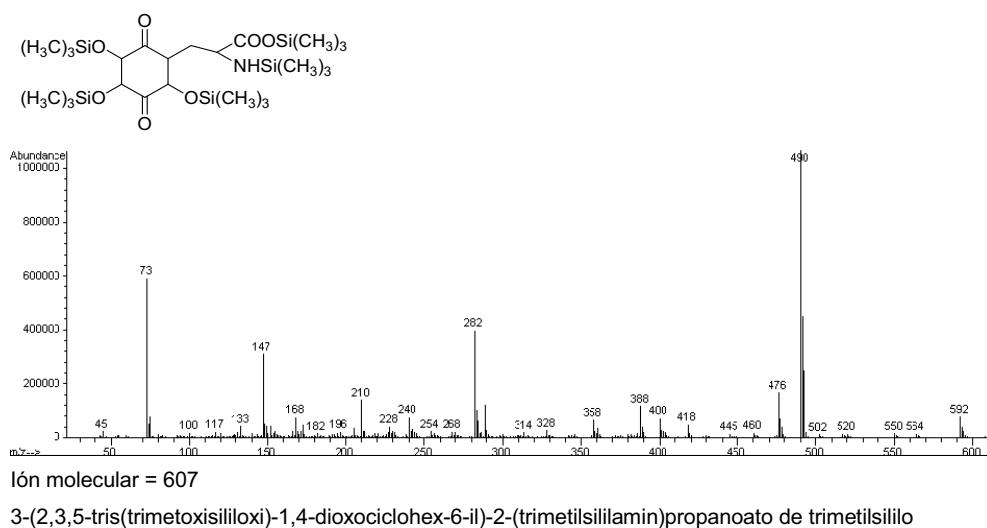
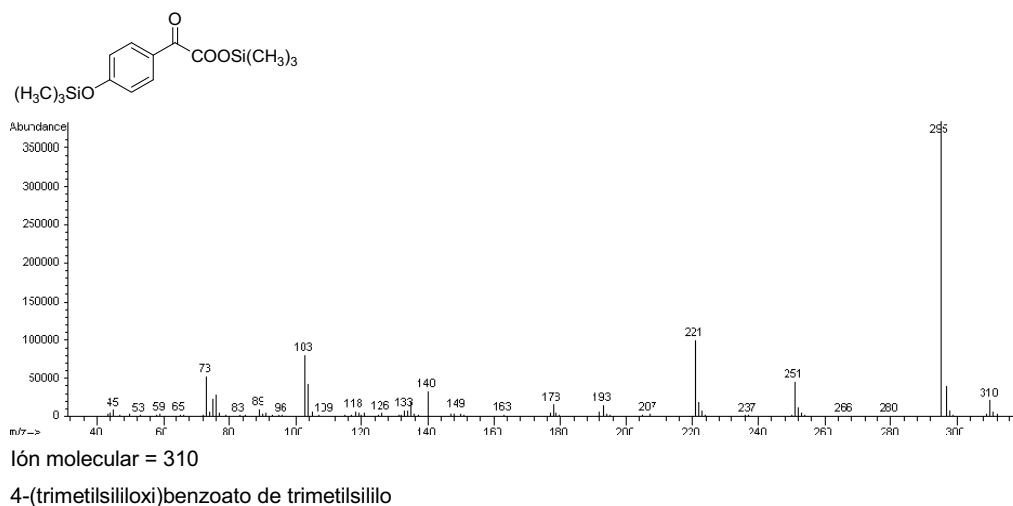
3-(1,3-bis(trimethylsilyl)-2-oxoimidazol-4-yl)-2-nitrosopropanoato de trimetilsililo

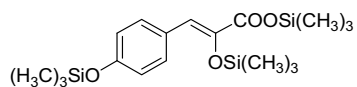


Íon molecular = 475

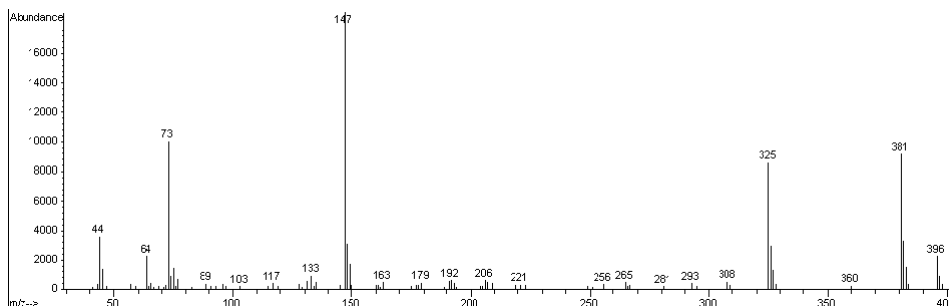
3-(1,3-bis(trimethylsilyl)-2-oxoimidazol-4-yl)-2-(trimethylsilyloxiimina)propanoato de trimetilsililo

Tabla 9.7. Espectros de masas de los derivados sililados de los productos de reacción identificados de la tirosina con ClO₂.



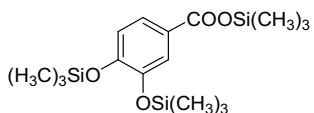


(nivel de coincidencia con NIST98, 98%)

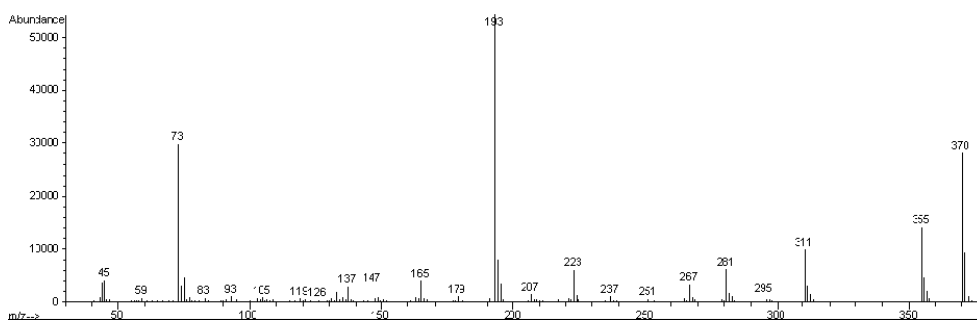


Íon molecular = 396

α , 4-bis(trimetilsililoxi)cinamato de trimetilsililo

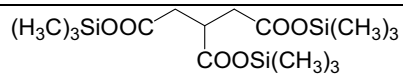


(nivel de coincidencia con NIST98, 99%)

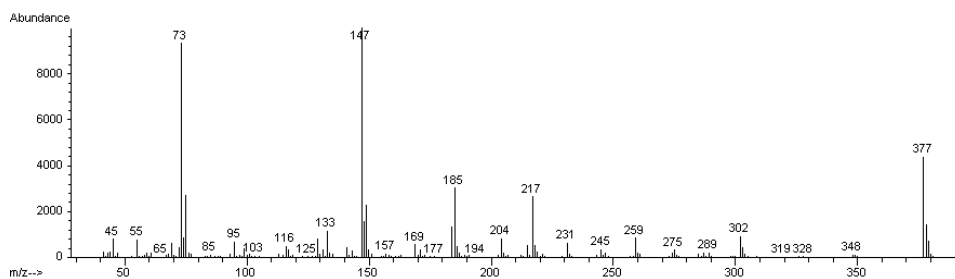


Íon molecular = 370

3,4-bis(trimetilsililoxi)benzoato de trimetilsililoxi

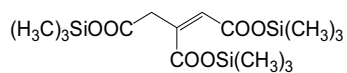


(nivel de coincidencia con NIST98, 90%)

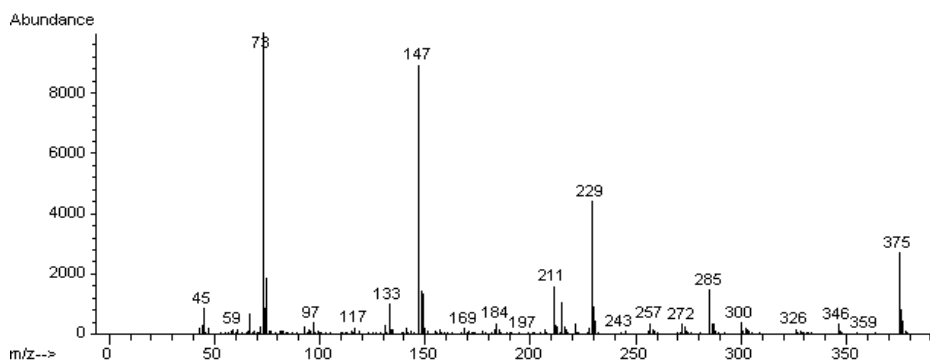


Íon molecular = 392

Dehidroxicitrato de tris(trimetilsililo)



(nivel de coincidencia con NIST98, 91%)



Íon molecular = 390

(Trimetilsililoxicarbonilmetil)fumarato de bis(trimetilsilil)

9.5 Experimentos de desinfección

Para los experimentos realizados, se ha empleado agua potable del sistema público de distribución de Valencia libre de *C.Parvum* y de *G.Lambliá*, a la cual se le eliminó el cloro y después se contaminó a propósito con estos protozoos. En las aguas reales^{11, 12} es muy común tener simultáneamente más de un microorganismo de los cuales uno puede ser más sensible a la desinfección que los otros. En el presente trabajo y con el objetivo de imitar en lo posible las condiciones reales, se añadió a la muestra de agua potable declorada estos dos protozoos.

150 litros de un agua modelo contaminada con *C.Parvum* y *G.Lambliá* fueron preparados a partir de un agua potable a la que previamente se le elimina el cloro mediante la adición de un exceso de tiosulfato. La ausencia de cloro se determina empleando el método de la N,N'-dietil-1,4-fenilendiamina (DPD) (ISO 7393-2:1985). Este volumen de agua sin cloro se mezcla posteriormente con 1 L de unas disoluciones acuosas contaminadas con los protozoos. Las dos disoluciones de 1 L se preparan por dilución de las muestras comerciales. El agua contaminada se almacena en un depósito (1.000 litros) y se recircula a través de un fotorreactor que trabaja a presión atmosférica a un flujo de 500 L h⁻¹.

Antes de la irradiación, el agua contaminada se recircula a través del sistema al menos durante 30 min a fin de asegurar la homogeneidad de la muestra. El tiempo de irradiación por ciclo bajo estas condiciones es de 0,63 min. La toma de muestra para análisis tiene lugar inmediatamente antes de la irradiación y al tiempo requerido tomando 25 litros de muestra a la salida del fotorreactor.

Aquellos experimentos que se realizan en presencia de hipoclorito, se llevaron a cabo añadiendo al agua potable inicialmente declorada la pequeña concentración de ClO⁻ requerida. La concentración de ClO⁻ indicada en la Tabla 8.1 se refiere a la concentración inicial de cloro inmediatamente después de la dosificación. Esta concentración inicial decrece durante el transcurso de la irradiación fotocatalítica. Es por ello que, en aquellas irradiaciones que lo contienen, se determina periódicamente y el valor se reestablece a la concentración inicial cuando las medidas indican que la cantidad de ClO⁻ es menor de 0,09 ppm. Los experimentos se llevan a cabo en duplicado manteniendo la población inicial de protozoos lo más similares posibles. En los experimentos realizados no se han observado diferencias significativas en los resultados de las irradiaciones replicadas.

9.6. Instrumentación y métodos analíticos empleados

9.6.1 Espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN en estado líquido se han registrado en un Varian Gemini 3000, 300 MHz para ^1H , empleando CH_3OH como referencia. Para la espectrometría de RMN- ^1H , las muestras se han disuelto en metanol perdeuterado o en agua deuterada conteniendo hidróxido sódico deuterado. Los espectros registrados en ambos disolventes han sido indistinguibles. Los espectros de RMN- ^{13}C en estado sólido empleando la técnica del ángulo mágico se han registrado en un Varian Inova-750 MHz.

9.6.2. Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo (IR-TF) de las muestras se han registrado a temperatura ambiente empleando un espectrofotómetro Jasco FT-IR-460 PLUS. Los residuos sólidos correspondientes a cada fracción (10 mg) se han mezclado con KBr anhidro en polvo (10 mg) y posteriormente se prensa la mezcla a 10 Toneladas cm^{-1} durante 5 min para obtener una pastilla autoconsistente. Antes de registrar el espectro IR-FT las muestras se secan a 40 °C durante 24 h.

9.6.3. Espectrometría de MALDI-TOF-MS

La espectrometría de masas de ionización-desorción por láser asistida por matriz (MALDI) acoplada con tiempo de vuelo (TOF) se ha llevado a cabo en un espectrómetro de masas Reflex IV (Bruker), con ionización y desorción producida por un pulso de láser de nitrógeno (337 nm) 5 ns, 2 mJx pulso asistido con una matriz de ditranol. Los experimentos se han llevado a cabo en modo reflector. El número de disparos fue de 150 y el digitalizador de demora 26000 ns. La polaridad del voltaje seleccionada ha sido positiva.

9.6.4. Espectrometría de masas mediante la técnica ESI-MS/MS

La espectrometría de masas basada en ionización por electroespray (ESI) acoplada con la espectrometría en tandem de masas-masas (MS/MS) se ha llevado a cabo en un sistema Bruker Esquire 3000 plus Ion Trap LC/MS(n). El instrumento Esquire 3000 estaba equipado con una fuente de ESI que actúa de interfase con un cromatógrafo HPLC por donde se inyecta la muestra a analizar. Los análisis se han llevado a cabo en modo positivo y negativo. Los espectros de masas se han adquirido en el rango de masas entre 100 y 1.700 m/z. La presión del gas He nebulizado, el flujo de gas de limpieza, el voltaje capilar y la temperatura de vaporización se han fijado a 7 psi, 6 L min^{-1} , 4.000 V y 300 °C, respectivamente.

9.6.5. Cromatografía de HPLC-UV en fase reversa

El análisis de muestras en fase acuosa por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se llevó a cabo en un equipo Water 600 Series acoplado a un detector de matriz de fotodiodos empleando como fase estacionaria la columna Kromasil-C18. La fase móvil empleada se especifica en la descripción de cada aplicación (9.4.3 ó 9.6.9).

9.6.6. Cromatografía de gases acoplada y detector de masas (CG-MS)

Los análisis de cromatografía de gases para la identificación de productos se realizaron empleando un cromatógrafo de gases (Cromatógrafo Hewlett Packard HP6890 CG-MS) y detector de masas (Agilent 5973). La columna capilar empleada (30 m) contiene en su fase estacionaria un 5% de fenil-metil-silicona (HP-5MS). La fase móvil empleada ha sido Helio ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$). El volumen de inyección ha sido de $1 \mu\text{L}$ (modo splitless). Las temperaturas de inyección y de detección han sido 250 y 280 °C, respectivamente. El programa de temperaturas del horno empieza a 50 °C durante 3 min, a partir de entonces aumenta a razón de 8 °C min^{-1} hasta 90 °C, y a continuación se mantiene esta temperatura durante 2 min para finalmente aumentar a razón de 15 °C min^{-1} hasta 280 °C que se mantiene entonces durante 10 min.

9.6.7. Análisis de THMs por cromatografía de gases

El contenido de THM se ha determinado empleando 2 métodos normalizados basados en la cromatografía de gases.

Método de espacio en cabeza

En el Capítulo 4, el análisis de los THMs generados tras cloración ha sido determinado mediante el análisis de gas en espacio de cabeza contenido en viales de 20 mL (conteniendo 10 mL de muestra), empleando un CG-ECD (cromatógrafo Carlo-Erba 8139 con captura electrónica y un automuestreador HS 2000) siguiendo el procedimiento estándar UNE-EN ISO 10301. Los análisis de gas cromatográficos se han llevado a cabo empleando helio como gas portador (85 kPa), y N_2 como gas de limpieza (110 kPa), empleando la columna capilar DB.624 (30 m, entrecruzada con un 5% de fenilmetilsilicona) e inyectando en el cromatógrafo 0.4 mL del gas en espacio en cabeza. Las temperaturas del inyector y detector han sido de 220 y 330 °C, respectivamente. La temperatura inicial del horno ha sido 50 °C y se ha mantenido durante 1 min, a partir de entonces aumenta a razón de 3 °C min^{-1} hasta 180 °C.

Método de purga y trampa

El contenido de THMs en los Capítulos 5 y 6 se ha determinado por el método de purga y trampa siguiendo el método US EPA 524.2¹³. Brevemente, se purgan 5 mL de la disolución acuosa conteniendo los THMs con una corriente de He (40 mL min⁻¹) durante 11 min y la corriente se pasa a través de un cartucho Vocab 3000. Después de la purga, se detiene la corriente de He y los compuestos volátiles atrapados en el cartucho se desorben calentando el cartucho a 180 °C. Los compuestos volátiles desorbidos se introducen en un CG-MS (Cromatógrafo Hewlett Packard HP6890 y detector de masas Agilent 5973) provisto con una columna capilar de 30 m (HP-5MS, entrecruzada con un 5% de metilfenilsilicona) y un analizador de cuadrupolo. La temperatura del horno del CG se programa a 40 °C durante 5 min aumentando a razón de 8 °C min⁻¹ hasta 280 °C. La calibración se realiza comparando los THMs con un patrón externo comercial de concentración conocida de THMs. Para todos los THMs el límite de detección, empleando el método descrito, es menor de 0,1 µg L⁻¹ y la precisión (variación de los valores para la misma muestra) menor de 1 µg L⁻¹.

9.6.8. Análisis de compuestos orgánicos polares por cromatografía de gases-espectrometría de masas previa derivatización.

La identificación de algunos productos orgánicos de polaridad media/alta se ha realizado mediante cromatografía de gases espectrometría de masas (CG-MS) tras realizar un procedimiento de sililación. Dicho procedimiento se ha aplicado a los siguientes casos: 1) a las fracciones aisladas del río Turia, con o sin hidrólisis previa; 2) a los productos derivados de la reacción del ClO₂ con antibióticos o amino ácidos.

En el caso de las fracciones derivadas del río Turia, éstas se acidifican a pH 2 con HCl (37%), se concentran a vacío a 40 °C y posteriormente se liofilizan. Seguidamente se extraen con metanol siendo la eficiencia de recuperación del material orgánico alrededor del 89% del COD. A continuación se elimina el metanol por destilación a vacío en un rotavapor a presión reducida y 40 °C. Finalmente una cantidad pesada del residuo se somete a sililación. En el caso de aplicar una hidrólisis a dichas fracciones se aplica un método descrito en la literatura para hidrolizar materia orgánica de agua¹⁴. Inicialmente se pesa una cantidad de muestra (25 mg) y se disuelve y/o suspende en 2 mL de NaOH (2 M). A continuación se purga con N₂ (20 min), se introduce en un reactor sellado y se vuelve a purgar con N₂ tras introducir la muestra. Seguidamente, el sistema se calienta a 170 °C durante 3 horas. Finalmente se acidifican las muestras con HCl (37%) hasta pH 2, se

extraen con metanol, sometiendo a dichas muestras a sililación. La eficacia de extracción del material orgánico ha sido 88% respecto al COD.

En el caso del análisis de los productos de reacción del ClO_2 con antibióticos o con amino ácidos, las muestras se acidifican a pH 2 con HCl (37%), se concentran a vacío (40 °C) y posteriormente se liofilizan. El liofilizado obtenido se somete directamente a sililación.

La sililación se lleva a cabo, tal y como se indica en la bibliografía ^{15,16}, suspendiendo las muestras anteriores en 0,5 ml de BSTFA+10%TMCS y seguidamente la disolución se agita a 80 °C durante 8 h. La mezcla sililada se disuelve en acetonitrilo anhidro, se filtra a través una membrana de nylon de 0,45 μm , y se inyecta en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (ver apartado 9.6.6).

La cuantificación de los productos de reacción se ha realizado empleando el método de patrón interno que consiste en la adición de una cantidad conocida de nitrobenzeno a la mezcla que se va a inyectar. En la calibración se asumió para todos los productos un factor de respuesta de 1. La ausencia de tampón hace más fácil el análisis de los productos no volátiles debido a que una gran cantidad del agente de derivatización se consume debido al tampón. La sililación completa de los productos de reacción requiere un gran exceso de BSTFA puesto que en otro caso no se alcanza dicho grado de sililación.

La identificación de productos se ha realizado en base a: 1) el espectro de masas del derivado sililado; 2) comparación del espectro de masas y del tiempo de retención en el CG del derivado sililado con muestras auténticas; 3) comparación del espectro de masas del derivado sililado con los datos de la librería (NIST98).

9.6.9. Análisis de amino ácidos de la materia orgánica del río Turia por HPLC-FR-UV previa hidrólisis y derivatización.

El contenido en aminoácidos de las fracciones individuales aisladas del río Turia se ha determinado empleando un HPLC-UV en fase reversa. Previamente se lleva a cabo una derivatización precolumna empleando fenilisotiocianato (FITC) ¹⁷. La fase estacionaria empleada es una columna Kromasil-C18 y la fase móvil trabajaba en condiciones de gradiente (ver abajo).

El reactivo de derivatización en precolumna consiste en una mezcla de etanol, agua, trietilamina y FITC (proporciones 7:1:1:1, en volumen) que se prepara inmediatamente antes de cada reacción a fin de prevenir el envejecimiento del reactivo.

La hidrólisis de oligopéptidos para el análisis de aminoácidos se lleva a cabo mezclando la muestra (15 mg) con 2 ml de HCl (6 M) y calentando la disolución a 110 °C durante 24 h. Después de este tiempo, el pH de la muestra se ajusta a 10 unidades empleando NaOH (2 M) para posteriormente evaporar el agua a vacío y a baja temperatura

(40 °C). Seguidamente se añaden a la muestra 40 µL de la mezcla que produce la derivatización conteniendo FITC. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 40 min y transcurrido ese tiempo de nuevo se seca la mezcla a vacío y a 40 °C. Finalmente, la muestra se redisuelve empleando 1 mL del disolvente A (ver siguiente párrafo), se filtra a través de un filtro de nylon de 0,45 µm y se inyecta inmediatamente en el HPLC para su análisis.

Los eluyentes para el HPLC consisten en una mezcla de dos disolventes (A y B). El disolvente A es una disolución acuosa tamponada preparada con acetato sódico 0.14 M, con 0.5 ml L⁻¹ de una disolución compuesta por etanol-agua-trietilamina en una proporción volumétrica 2:2:1 y valorada a pH 6,3 con ácido acético glacial. El disolvente B consiste en una mezcla de acetonitrilo en agua al 60%. El gradiente lineal empleado empieza en 90%A/10%B y finaliza en 50%A / 50%B en 45 min. A partir de ese tiempo se continua entre los minutos 45 y 50 con gradiente hasta alcanzar 100% B, manteniéndose a 100% de B entre los minutos 50 y 55 para volver finalmente a 90% A/10% B entre los minutos 55 y 60. El flujo de la fase móvil es de 0,9 mL min⁻¹ y el volumen de inyección de 200 µL. Este método tiene un límite de detección para el análisis de amino ácidos de 1 a 5 nanogramos. La cuantificación de los aminos ácidos se lleva a cabo empleando muestras patrón de aminoácidos en las condiciones descritas anteriormente.

9.6.10. Análisis elemental de combustión

Los análisis elementales de C, N, H y S se han llevado a cabo empleando un analizador Perkin Elmer CHNOS. La calibración se ha realizado introduciendo bencenosulfonilamida cada cinco muestras analizadas y comprobando que los valores medidos de C, H, N y S corresponden con los valores teóricos de este patrón.

9.6.11. Análisis de carbono orgánico total (COT) por combustión

El COT se ha analizado empleando un instrumento High-TOC Elemental II. La determinación se basa en una combustión completa de la materia orgánica en agua catalizada por platino a 950 °C y detección por IR del CO₂ generado que además es cuantificado por la intensidad de las bandas correspondientes.

9.6.12. Análisis de cloruro por cromatografía iónica

La determinación de cloruros en disolución acuosa se ha realizado por cromatografía iónica (DIONEX ICS-1000, equipado con una columna AG9H/AS9HC y detector de conductividad) después de la reducción completa del cloro libre con arsenito sódico (NaAsO₂).

Las valoraciones de cloruros se han llevado a cabo al tiempo inicial y después de 72 horas de contacto (con 10 mg L^{-1} de cloro) con disoluciones modelo de sacáridos. La diferencia entre la concentración inicial y final de cloruros se relacionó con la formación de moléculas orgánicas cloradas y particularmente con triclorometano (CHCl_3).

9.6.13. Análisis de protozoos

Los análisis para la determinación de *Cryptosporidium Parvum* y *Giardia Lamblia* los ha llevado a cabo un laboratorio certificado e independiente, GAMASER S.A (Valencia). El procedimiento aplicado determina simultáneamente la población de *C.Parvum* y *G.Lamblia* contando los oocitos/quistes de estos dos protozoos por epifluorescencia en un microscopio (Figuras 9.7 y 9.8).

Análisis de C.Parvum y G.Lamblia

El protocolo aplicado se basa en el método EPA 1623¹⁸. Este procedimiento para analizar las muestras acuosas de *C.Parvum* y *G.Lamblia* consiste en tres etapas la primera de las cuales es la filtración de la muestra, seguida de la separación inmunomagnética (IMS) de los protozoos y finalmente el ensayo de microscopía de inmunofluorescencia (FA). Este método no identifica la mancha de *C.Parvum* o de *G.Lamblia*, ni puede determinar la viabilidad o infectividad de los oocitos ó quistes detectados (método EPA 1623).

Los pasos para estimar la concentración de *C.Parvum* y *G.Lamblia*, descritos en el método EPA, son los siguientes:

a. Filtración, elución y separación

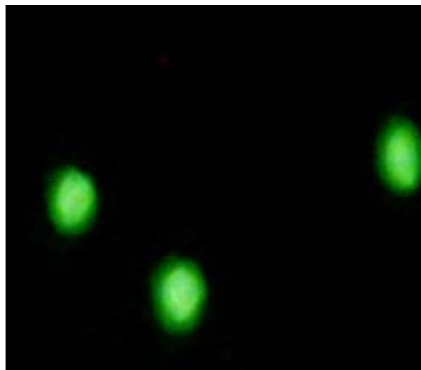
Se filtran 20 L de la muestra de agua a través de un cartucho (Envirocheck de Pall, $1 \mu\text{m}$) para retener los oocitos o quistes de *C.Parvum* y *G.Lamblia*, respectivamente. Los materiales en el filtro se eluyen con un tampón (conteniendo el antiespumante Laurent12, Tris and EDTA), el eluato se centrifuga para separar los oocitos y quistes, y el fluido sobrenadante se elimina. Los oocitos y quistes se magnetizan por fijación de esferas magnéticas ($300 \mu\text{m}$ diámetro) que tienen enlazadas covalentemente anticuerpos de anti-*C.Parvum* y anti-*G.Lamblia*. Los oocitos y quistes magnetizados se separan de los materiales extraños empleando un imán. El complejo de las esferas magnéticas y los protozoos se destruye por tratamiento a pH 5 lo que permite separar los oocitos y quistes.

b. Contaje de oocitos y quistes

Los oocitos y quistes se colocan sobre portas de microscopio que presentan un pozuelo y se tiñen con anticuerpos monoclonales etiquetados fluorescentemente con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ver Figuras 8.3b y 8.4b). Las muestras teñidas se examinan empleando fluorescencia (fluoresceína-5-isotiocianato, FITC) (ver Figuras 8.3a y 8.4a) y microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Los oocitos de *C.Parvum* contienen cuatro esporozoitos en forma de plátano. Se considera recuento positivo cuando se observan uno o más esporozoitos por el microscopio (tinción por DAPI). La *G.Lamblia* tiene cuatro núcleos y en este caso una cuenta positiva requiere la observación en el microscopio (tinción por DAPI) de al menos un núcleo.

Figura 9.7. Imagen de *C.Parvum* mediante el empleo como colorante FITC (a) y DAPI (b). Las flechas muestran las características regiones polares de *C.Parvum*

Morfología típica de *C.Parvum* (a)



Esporozoitos en *C.Parvum* (b)

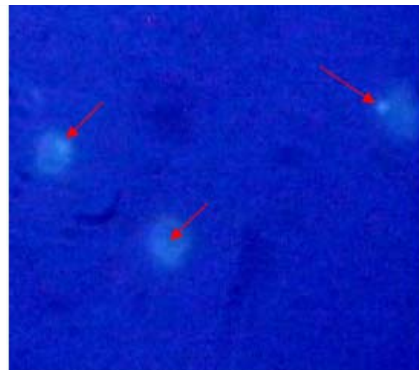
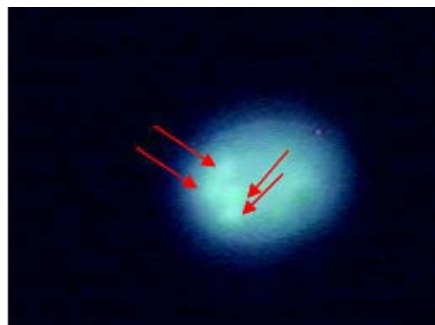


Figura 9.8. Imagen por microscopio de *G.Lamblia* mediante el empleo del colorante FITC (a) y DAPI (b). Las flechas muestran las regiones características polares de *G.Lamblia*

Morfología típica de *G.Lamblia* (a)



Núcleos en *G.Lamblia* (b)



9.7 Referencias bibliográficas

- [1] E.M. Thurman, Preparative isolation of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Technol.*, 15 (1981) 463-66.
- [2] I. Toshihiro, Y. Hiroyuki, H. Yoshikatsu, T. Fujii, T. Nagasawa, A general process for in situ formation of functional surface layers on ceramics, *Nature* 416 (2002) 64-66.
- [3] M. Burke, J. Tenney, B. Indu, M.F. Hoq, S. Carr, WR Ernst, Kinetics of hydrogen peroxide-chlorate reaction in the formation of chlorine dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 32 (1993) 1449-56.
- [4] APHA, Standard methods for the examination of water and wastewater, twentieth ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, DC. (1998).
- [5] G. Gordon, A.A. Rosenblatt, Chlorine dioxide: the current state of the art, *Ozone Sci. Eng.* 27 (2005) 203-07.
- [6] D. Gates, The chlorine dioxide handbook, American Water Works Association, Denver. (1998).
- [7] D.P. Kessler, M. Cushman, I. Ghebre-Sellassie, A.M. Knevel, S.L. Hem, Investigation of a proposed penicillin G acidic degradation scheme using high-pressure liquid chromatography and optimization techniques and mechanistic considerations, *Perkin Trans.*, 2(1972-1999) (11), 1699-1703. (1983).
- [8] G.P. Nora, M.J. Miller, U. Moellmann, The synthesis and in vitro testing of structurally novel antibiotics derived from acylnitroso Diels-Alder adducts, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* 16 (2006) 3966-79.
- [9] M. Chakrabarty, K. Shampa, Y. Harigaya, Y. Konda, Neat formic acid: an excellent N-formylating agent for carbazoles, 3-alkylindoles, diphenylamine and moderately weak nucleophilic anilines, *Synthetic Communications* 30 (2000) 187-200.
- [10] M.T.S. Yamada, Preparation of 5-hydroxyhydantoin, *Eur. Pat. Appl.* (1991).
- [11] Z. Bukhari, H.V. Smith, N. Sykes, S.W. Humphreys, C.A. Paton, R.W.A. Girdwood, C.R. Fricker, Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England, *Water Sci Technol* 35 (1997) 385-90.
- [12] C.M. Hancock, J.B. Rose, M. Callahan, *Crypto and Giardia in U.S. groundwater*, *J. Am. Water Works Ass.* 58 (1998) 58-61.
- [13] M. US EPA, Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry, US EPA, Cincinnati, OH, (1995).
- [14] Swift, R. Humic Substances II: In Search of Structure. Hayes MHB, McCarthy P, Malcolm RL, Swift RS (eds). John Wiley: Chichester. 449, 1989.
- [15] D. Li, J. Park, J.R. Oh, Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3089-95.
- [16] W.V. Ligon, H. Grade, Techniques for postcolumn derivatization in gas chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 255-61.
- [17] W.J. Dress, S.J. Newell, A.J. Nastase, J.C. Ford, Analysis of amino acids in nectar from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae), *American Journal of Botany* 84 (1997) 1701-06.
- [18] US EPA 1999 US EPA Method 1623, *Cryptosporidium and Giardia in water by Filtration/IMS/FA*, EPA-821-R-99-006.

Conclusiones

Conclusiones

Los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Con respecto a la materia orgánica disuelta (MOD) del río Turia los datos de caracterización demuestran que:
 - 1.1 La gran mayoría de los componentes individuales presentes en la MOD tienen pesos moleculares notablemente bajos. Así el 50% de los compuestos orgánicos no son retenidos por membranas de peso de corte molecular de 270 Da. Además, únicamente un 4% del total de los compuestos son retenidos empleando una membrana de corte molecular de 1.000 Da. De acuerdo con la MOD retenida dependiendo del tamaño de corte de peso molecular de la membrana MALDI-TOF-MS también indica igualmente que las masas moleculares están por debajo de 2.000 Da. La mayor parte de todos los compuestos están alrededor de 800 Da.
 - 1.2 Los principales componentes de la materia orgánica disuelta son polisacáridos, ácidos grasos y ácidos policarboxílicos. El contenido en amino ácidos está por debajo de $1 \mu\text{g mg}^{-1}$ de MOD a excepción del ácido aspártico y la prolina que se han detectado en concentraciones de 11,8 y $7,01 \mu\text{g mg}^{-1}$, respectivamente.
 - 1.3 El sistema de fraccionamiento basado en las resinas de adsorción DAX8/XAD4 no es eficiente para la separación selectiva de los compuestos presentes en esta agua natural y las diferentes fracciones tienen muchos compuestos comunes.
 - 1.4 Los ácidos húmicos y fúlvicos que generalmente se consideran estar presentes en todos los tipos de aguas superficiales están ausentes en el agua del río Turia.
 - 1.5 La detección de paracetamol en el agua del río Turia prueba que este recurso hídrico presenta contaminación antropogénica.
2. Con respecto a la formación de trihalometanos (THMs) a partir de la cloración de disoluciones modelo de mono- y oligosacáridos se concluye que:
 - 2.1 Los mono- y oligosacáridos forman concentraciones de THMs (alrededor de $100 \mu\text{g L}^{-1}$) al ser clorados, en condiciones relevantes en el tratamiento de aguas potables.

- 2.2 Los principales parámetros que influyen en la concentración de THMs formados a partir de carbohidratos son: El pH de la disolución (pH ácidos tiene un efecto favorable disminuyendo el PFTHM así como el consumo de cloro), la presencia de iones cloruro (en mg L^{-1}) y bromuro (en $\mu\text{g L}^{-1}$) aumenta significativamente la concentración de THMs.
 - 2.3 El ión bromuro es más eficiente que el cloruro promoviendo la formación de THMs y la mayor parte del bromuro inicial (hasta un 100% del balance de masas) acaba formando parte de los THMs sin promover interconversión alguna entre los THMs individuales, puesto que todos los THMs aparecen como productos estables y primarios.
3. Del estudio de la formación de THMs en presencia de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} se derivan las siguientes conclusiones.
 - 3.1 La presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} en disoluciones de compuestos modelo y en el agua del río Turia aumenta la formación de THMs.
 - 3.2 La actividad catalítica está relacionada con la acidez de Lewis de dichos metales y con su capacidad de promover procesos redox siguiendo el orden $\text{Cu}^{+2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2}$.
 4. La aplicación del ClO_2 a disoluciones modelo de antibióticos β -lactámicos en condiciones relevantes al tratamiento de aguas potables (pH 8 y concentraciones diluidas) muestra que:
 - 4.1 El ClO_2 reacciona estequiométricamente con amoxicilina y cefadroxil dando lugar a la formación de compuestos fenólicos en los cuales el anillo β -lactámico ha sido descompuesto. La penicilina actúa como organocatalizador promoviendo la descomposición del ClO_2 en agua.
 - 4.2 Cuando el cloro se añade después del tratamiento con ClO_2 , se observa una reducción el valor de THMs para aquellos casos en los cuales el ClO_2 reacciona con los antibióticos estequiométricamente.
 5. El estudio de la reactividad del ClO_2 con disoluciones modelo de aminoácidos (triptófano, tirosina e histidina) ha resultado en las siguientes conclusiones:
 - 5.1 La determinación de la ruta de degradación no puede basarse en la caracterización de los productos en unas condiciones de reacción puesto

- que la distribución de productos de reacción varía notablemente dependiendo del exceso o no de ClO_2 y de la presencia o no de oxígeno.
- 5.2 La distribución de productos cambia drásticamente dependiendo de la cantidad de ClO_2 empleada, de cantidades subestequiométricas a exceso con respecto a los aminoácidos, y también cambia dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno.
- 5.3 Al igual que en el caso de los antibióticos β -lactámicos se ha observado una reducción en la concentración de THMs y en el consumo de cloro cuando las disoluciones de los tres amino ácidos son pretratadas con ClO_2 con anterioridad a la cloración.
6. Los resultados de desinfección fotocatalítica de *Cryosporidium Parvum* y *Giardia Lamblia* empleando un reactor UV implementado con una fibra cerámica de TiO_2 indican que:
- 6.1 El sistema fotocatalítico basado en TiO_2 cerámico es altamente eficiente para promover la desinfección en flujo continuo de dichos protozoos resistentes a la desinfección por cloro o luz.
- 6.2 La acción de este sistema fotocatalítico se ve notablemente mejorada por la presencia de hipoclorito en concentraciones muy bajas.

Conclusions

The results obtained in the present doctoral thesis allow drawing the following conclusions:

1. With respect to dissolved organic matter (DOM) from the Turia river water, the characterization data have shown that:
 - 1.1 The vast majority of individual components present in the DOM have remarkably low molecular weights. So 50% DOM is not retained by the membrane with a cut-off of 270 Da. Furthermore, only 4% of all compounds are retained using a membrane with a cut off of 1,000 Da. In agreement with the DOM retained depending on the membrane cut off MALDI-TOF-MS also indicates that the molecular weights are below 2,000 Da. Most of all compounds are about 800 Da.
 - 1.2 The main components of DOM are polysaccharides, fatty acids and polycarboxylic acids. The amino acid content is below $1 \mu\text{g mg}^{-1}$ DOM except aspartic acid and proline that have been detected at concentrations of 11.8 and $7.01 \mu\text{g mg}^{-1}$, respectively.
 - 1.3 The fractioning system based on adsorption resins DAX8/XAD4 is not efficient for the selective separation of the compounds present in this natural water and the different fractions have many common compounds.
 - 1.4 The humic and fulvic acids that are generally considered to be ubiquitous in all types of surface waters are absent in the Turia river water.
 - 1.5 Detection of paracetamol in the Turia river water proves that this hydric resource has anthropogenic pollution.

2. With respect to trihalomethanes (THMs) formation upon chlorination of model solutions of mono- and oligosaccharides it can be concluded that:
 - 2.1 Mono- and oligosaccharides solutions produce THMs (about $100 \mu\text{g L}^{-1}$) upon chlorination under relevant conditions to drinking water treatment.
 - 2.2 The main parameters that influence THM concentration formed from carbohydrates are: the pH of the solution (acidic pH has a favourable effect decreasing the THMFP as well as the chlorine consumption). Similarly the presence of chloride ions (in mg L^{-1}) and bromide (in mg L^{-1}) significantly increases the concentration of THMs.

- 2.3 The bromide ion is more efficient than chloride promoting THMs formation and most of the initial bromide (up to 100% of the mass balance) ends as a part of the THMs without promoting any interconversion between the individual THMs, since all THMs appear as stable and primary products.
3. The study of the formation of THMs in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} leads to the following conclusions.
 - 3.1 The presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} in solutions of model compounds and in the Turia river water increases the formation of THMs.
 - 3.2 The catalytic activity is related to the Lewis acidity of these metals and to their ability to promote redox processes in the order $\text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$.
4. Treatment of laboratory solutions containing β -lactam antibiotics with ClO_2 under conditions relevant to drinking water potabilization (pH 8 and dilute concentrations) shows that:
 - 4.1 The ClO_2 reacts stoichiometrically with amoxicillin and cefadroxil resulting in the formation of phenolic compounds in which the β -lactam ring has been decomposed. Penicillin acts as organocatalyst promoting the decomposition of ClO_2 in water.
 - 4.2 When chlorine is added after ClO_2 treatment, a reduction of THMs formation was observed in those cases in which the ClO_2 reacts with antibiotics stoichiometrically.
5. The study of the reactivity of ClO_2 with model solutions of amino acids (tryptophan, tyrosine and histidine) has led to the following conclusions:
 - 5.1 The determination of the route of degradation cannot rely on the characterization of the products in a single reaction condition since the products distribution varies greatly depending on the excess or not ClO_2 and the presence or absence of oxygen.
 - 5.2 The product distribution changes drastically depending on the amount of ClO_2 employed from substoichiometric to excess with respect to the amino acids and also changes depending on the presence or absence of oxygen.
 - 5.3 Like in the case of β -lactam antibiotics it has been observed that the formation of THMs and chlorine consumption are reduced when aqueous solution of this amino acids are pre-treated with ClO_2 prior to chlorination.

6. The results of the photocatalytic disinfection *Cryposporidium Parvum* and *Giardia Lamblia* using a UV reactor with TiO₂ ceramic fiber indicate that:
 - 6.1 The photocatalytic system based on ceramic TiO₂ is highly efficient to promote under continuous flow the disinfection of these protozoa that are resistant to disinfection by chlorine or light.
 - 6.2 The photocatalytic action of this system is greatly enhanced by the presence of hypochlorite in very low concentrations.

Resúmenes

Resumen en castellano

Uno de los mayores logros en salud pública a principios del siglo XX fue la introducción de cloro como agente desinfectante en los sistemas de potabilización. Sin embargo hoy en día se sabe que dicho cloro no es totalmente eficiente para la inactivación de algunas esporas, quistes, ooquistes ó virus. Además, desde 1974 se conoce que el cloro añadido como agente desinfectante reacciona con la materia orgánica presente en el agua para dar lugar a compuestos clorados entre los que se encuentran los trihalometanos (THMs). Actualmente los THMs están considerados como compuestos potencialmente cancerígenos, genotóxicos y mutagénicos. Además están regulados en España a través del RD 140/2003 a un nivel máximo de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Por estas razones en la actualidad algunas plantas de tratamiento de aguas potables trabajan con desinfectantes alternativos al cloro (principalmente ClO_2 ó O_3) que tienen un mayor poder de desinfección y reducen la formación de THMs.

Debido a la interacción del cloro añadido como desinfectante con la materia orgánica disuelta y a la formación de subproductos de la desinfección, se han realizado numerosos estudios dirigidos a la caracterización de dichos precursores orgánicos. De modo general se puede decir que la materia orgánica disuelta está formada por una fracción hidrófoba (ácidos húmicos, fúlvicos y/o derivados de la lignina) y una fracción hidrófila (sacáridos, proteínas, compuestos de polaridad media/alta con grupos carbonílicos cetónicos y/o carboxílicos). Los ácidos húmicos y fúlvicos, derivados del proceso de humificación de la materia orgánica derivada de plantas y suelos, son macromoléculas formadas por compuestos de elevado peso molecular constituidos por subestructuras aromáticas sustituidas (principalmente con grupos -OH, COOH) y en menor medida por estructuras tipo sacárido y alifáticas. Dichos compuestos, representados generalmente por unidades de compuestos fenólicos y derivados (principalmente 1,3-dihidroxibencenos), han sido ampliamente aceptados como los principales responsables precursores en la formación de los subproductos de la desinfección (SPDs). Actualmente, otro tipo de compuestos que ha tomado especial importancia en la formación de SPDs son los compuestos β -dicarbonílicos.

Además de la materia orgánica disuelta, muchos compuestos derivados de la actividad humana están siendo detectados en las aguas de abastecimiento o potables. Algunos de estos compuestos han sido regulados (p.ej. la presencia de pesticidas) aunque actualmente hay un grupo de contaminantes emergentes como son los compuestos farmacéuticos. Además, la presencia de estos compuestos cuestiona la efectividad de los sistemas de tratamiento de aguas para la eliminación de este tipo de contaminantes.

Considerando estos precedentes nos propusimos realizar un estudio de los parámetros de calidad relacionados con la materia orgánica disuelta y con microorganismos resistentes a la cloración.

Inicialmente se procedió a la caracterización de la materia orgánica disuelta del río Turia (Capítulo 3). Se escogió este recurso acuático natural por ser una de las principales fuentes de abastecimiento de agua potable para Valencia y su área metropolitana. Entre las diversas conclusiones que se derivan del estudio cabe destacar la abundancia de estructuras derivadas de polisacáridos y de ácidos grasos. Además, inesperadamente no se observa la presencia de ácidos húmicos y fúlvicos fácilmente reconocibles con las técnicas espectroscópicas empleadas. En contraste, ha sido de interés el detectar la presencia de paracetamol, un compuesto considerado contaminante emergente en las aguas de abastecimiento. Teniendo en cuenta el alto contenido en polisacáridos en el agua del río Turia, se procedió a evaluar el comportamiento de los carbohidratos como precursores de THMs tras su interacción con cloro (Capítulo 4). Los resultados indican que aunque los valores de THMs obtenidos son menores respecto a los modelos tradicionales de ácidos húmicos y fúlvicos, en aquellos sistemas en los que existan elevadas concentraciones de carbohidratos éstos pueden contribuir notablemente a la formación de THMs.

Estudios previos habían demostrado que la presencia de cationes metálicos (p.ej. cobre) es un factor determinante en la formación de THMs. Basándonos en estos precedentes y teniendo en cuenta la alta concentración de otros cationes metálicos en las aguas naturales evaluamos la influencia de la presencia de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} en la formación de THMs, tras la cloración de disoluciones modelo y una muestra de agua del río Turia (Capítulo 5). Los resultados de dicho estudio indican que cuando dichos iones están presentes durante el proceso de cloración la formación de THMs se ve notablemente favorecida.

Considerando la presencia de contaminantes emergentes y de algunos reconocidos precursores de THMs en los recursos acuáticos naturales evaluamos la reactividad de antibióticos β -lactámicos (penicilina, amoxicilina y cefadroxil, Capítulo 6) y de amino ácidos (triptófano, tirosina e histidina, Capítulo 7) frente al ClO_2 . Se concluye del estudio que el ClO_2 es efectivo para la eliminación de amoxicilina y cefadroxil bajo condiciones típicas de tratamiento (pH 8, temperatura ambiente, condiciones acuosas diluídas) e ineficiente para la penicilina en estas condiciones. Además, se ha realizado un estudio de los productos de reacción bajo diversas condiciones que ha permitido proponer un mecanismo de reacción del ClO_2 con los antibióticos seleccionados y con los aminoácidos, que está de acuerdo con datos y reactividad del ClO_2 . Finalmente, se ha

comprobado que cuando se aplica el ClO₂ como pretratamiento a la cloración su uso es efectivo para la reducción de THMs para estos tipos de compuestos.

Finalmente, se ha evaluado la eficacia de desinfección de un sistema fotocatalítico basado en fibras de TiO₂ para la descontaminación de aguas contaminadas con microorganismos resistentes a la cloración (*Cryptosporidium Parvum* y *Giardia Lamblia*, Capítulo 8). Los resultados obtenidos demuestran que el sistema UV/TiO₂ es eficaz para conseguir la descontaminación completa de estos protozoos trabajando en condiciones reales de tratamiento. El cloro desempeña un papel sinérgico en el sistema reduciendo considerablemente los tiempos de exposición necesarios para llevar a cabo una desinfección efectiva.

Resum en valencià

Un dels majors èxits en salut pública a principis del segle XX va ser la introducció del clor com a agent desinfectant en els sistemes de potabilització. No obstant això, hui en dia se sap que aquest clor no és totalment eficient per a la inactivació d'algunes espores, quists, oóquits ó virus. A més, des de 1974 es coneix que el clor afegit com a agent desinfectant reacciona amb la matèria orgànica present en l'aigua per a donar lloc a compostos clorats entre els quals es troben els trihalometans (THMs). Actualment els THMs estan considerats com a compostos potencialment cancerígens, genotòxics i mutagènics. A més estan regulats a Espanya pel RD 140/2003 a un nivell màxim de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Per aquestes raons en l'actualitat algunes plantes de tractament d'aigües potables treballen amb desinfectants alternatius al clor (principalment ClO_2 o O_3) que tenen un major poder de desinfecció i redueixen la formació de THMs.

A causa de la interacció del clor afegit com a desinfectant amb la matèria orgànica dissolta i a la formació de subproductes de la desinfecció, s'han realitzat nombrosos estudis dirigits a la caracterització d'aquestos precursors orgànics. En general es pot dir que la matèria orgànica dissolta està formada per una fracció hidròfoba (àcids húmics, fúlvics i/o derivats de la lignina) i una fracció hidròfila (sacàrids, proteïnes, compostos de polaritat mitja/alta amb grups carbonílics, cetònics i/o carboxílics). Els àcids húmics i fúlvics, derivats del procés d'humificació de la matèria orgànica derivada de plantes i sòls, són macromolècules formades per compostos d'elevat pes molecular constituïts per subestructures aromàtiques substituïdes (principalment amb grups -OH, -COOH) i en menor mesura per estructures tipus sacàrid i alifàtiques. Aquests compostos, representats generalment per unitats de compostos fenòlics i derivats (principalment 1,3-dihidroxibenzens), han sigut àmpliament acceptats com els principals precursors responsables de la formació dels subproductes de la desinfecció (SPDs). Actualment, un altre tipus de compostos amb especial importància en la formació de SPDs són els compostos β -dicarbonílics.

A més de la matèria orgànica dissolta, molts compostos derivats de l'activitat humana estan sent detectats en les aigües de proveïment o potables. Alguns d'aquestos compostos han sigut regulats (per exemple la presència de pesticides) encara que actualment hi ha un grup de contaminants emergents com són els compostos farmacèutics. Així mateix, la presència d'aquestos compostos qüestiona l'efectivitat dels sistemes de tractament d'aigües per a l'eliminació d'aquests tipus de contaminants.

Considerant aquestos precedents, ens proposarem realitzar un estudi dels paràmetres de qualitat relacionats amb la matèria orgànica dissolta i microorganismes resistents a la cloració.

Inicialment es va procedir a la caracterització de la matèria orgànica dissolta del riu Túria (Capítol 3). Es va triar aquest recurs aquàtic perquè és una de les principals fonts de proveïment d'aigua potable per a València i àrea metropolitana. De les diverses conclusions que es deriven de l'estudi, cal destacar l'abundància d'estructures derivades de polisacàrids i àcids grassos. Endemés, de manera inesperada no es va observar la presència d'àcids húmics i fúlvics fàcilment reconeixadors amb les tècniques espectroscòpiques empleades. En contrast, ha sigut d'interès detectar la presència de paracetamol, un compost considerat com a contaminant emergent en les aigües de proveïment. Tenint en compte l'elevat contingut en polisacàrids en l'aigua del riu Túria, es va procedir a avaluar el comportament dels carbohidrats com a precursors de THMs després d'haver interactuat amb el clor (Capítol 4). Els resultats indiquen que encara que els valors de THMs obtinguts són menors respecte als models tradicionals d'àcids húmics i fúlvics, en aquells sistemes en els quals hi hagen elevades concentracions de carbohidrats, aquestos poden contribuir notablement a la formació de THMs.

Estudis previs havien demostrat que la presència de cations metàl·lics (per exemple coure) és un factor determinant en la formació de THMs. Basant-nos en aquestos precedents i tenint en compte l'alta concentració d'altres cations metàl·lics en les aigües naturals, vam avaluar la influència de la presència dels ions Ca^{+2} i Mg^{+2} en la formació de THMs després de la cloració de dissolucions model i una mostra de l'aigua del riu Túria (Capítol 5). Els resultats d'aquest estudi indiquen que quan aquestos ions estan presents durant el procés de cloració, la formació de THMs està notablement afavorida.

Considerant la presència de contaminants emergents i d'alguns reconeguts precursors de THMs en els recursos acuàtics naturals, vam avaluar la reactivitat d'antibiòtics β -lactàmics (penicil·lina, amoxicil·lina i cefadroxil, capítol 6) i d'aminoàcids (triptòfan, tirosina i histidina, Capítol 7) amb el ClO_2 . Es conclou de l'estudi que el ClO_2 es efectiu per a l'eliminació d'amoxicil·lina i cefadroxil en condicions típiques de tractament (pH 8, temperatura ambient, condicions aquoses diluïdes) i ineficient per a la penicil·lina en aquestes condicions. A més, s'ha elaborat un estudi dels productes de reacció davall diverses condicions que han permés proposar un mecanisme de reacció del ClO_2 amb els antibiòtics seleccionats i amb els aminoàcids el qual està d'acord amb les dades i reactivitat del ClO_2 . Finalment, s'ha comprovat que quan s'aplica el ClO_2 com a pretractament a la cloració el seu ús és efectiu per a la reducció de THMs per a aquests tipus de compostos.

En últim lloc, s'ha avaluat l'eficàcia de desinfecció d' un sistema fotocatalític basat en fibres de TiO_2 per a la descontaminació d'aigües contaminades amb microorganismes resistents a la cloració (*Cryptosporidium Parvum* i *Giardia Lamblia*, Capítol 8). Els resultats obtinguts demostren que el sistema UV/ TiO_2 és eficaç per a aconseguir la descontaminació completa d'aquestos protozous treballant amb condicions reals de tractament. El clor a compleix un paper sinèrgic en el sistema, ja que redueix considerablement els temps d'exposició necessaris per a realitzar una desinfecció efectiva.

English summary

One of the greatest public health achievements in the early twentieth century was the introduction of chlorine as disinfectant in drinking water treatment plants. However it is known that chlorine is not totally effective in inactivating spores, cysts, oocysts or virus. In addition, since 1974 it has been proved is known that the chlorine added as a disinfectant reacts with the organic matter present in water to give rise to chlorinated compounds among which the ones that have attracted more attention are the trihalomethanes (THMs). Currently THMs are considered potentially carcinogenic, genotoxic and mutagenic compounds. The maximum concentration of THMs in water is regulated in Spain through the RD 140/2003 to a maximum of $100 \mu\text{g L}^{-1}$. For these reasons currently some drinking water treatment plants work with alternative disinfectants different to chlorine (mainly ClO_2 or O_3) that have greater disinfection power and reduce THM formation.

Due to the interaction of chlorine added as disinfectant with dissolved organic matter and the formation of disinfection byproducts, there have been numerous studies aimed at the characterization of these organic precursors present in hydric resources. In general dissolved organic matter consists on a hydrophobic fraction (humic and fulvic acids and/or lignin derivatives) and a hydrophilic fraction (polysaccharides, proteins, compounds with medium/high polarity with carbonyl and/or carboxylic groups). Humic and fulvic acids derived from the humification process of organic matter from plants and soils are macromolecules formed by high molecular weight compounds consisting of aromatic substructures substituted with functional groups, mainly -OH and -COOH groups, and to a lesser extent by saccharide and aliphatic structures. These compounds, usually represented by phenolic units (mainly 1,3-dihydroxybenzene derivatives) have been widely accepted as the main responsible for the formation of the disinfection by-products (DBPs). Currently, other compounds that have gained importance in the formation of DBPs are β -dicarbonyl compounds.

Besides the natural dissolved organic matter, many compounds derived from human activity are increasingly being detected in water supplies or drinking water. Some of these compounds have been regulated (i.e. the presence of pesticides) but there is now a group of emerging pollutants consisting in pharmaceutical compounds and their metabolites. Furthermore, the presence of these compounds raises large concern on the effectiveness of water treatment systems for the efficient removal of such and related compounds.

Given these precedents in the present study we have focused on the water quality parameters related to dissolved organic matter and microorganisms resistant to chlorination.

Initially we proceeded to the characterization of dissolved organic matter from the Turia river (Chapter 3). This natural water resource is one of the main sources of drinking water to Valencia and its metropolitan area (1,500,000 consumers). Among the various conclusions drawn from the study it is remarkable the abundance of compounds with polysaccharides structure as well as fatty acids. It is also remarkable that unexpectedly we did not observe the presence of humic and fulvic acids in Turia river. Humic and fulvic acids are easily detectable by the spectroscopic techniques employed. In contrast, our study has detected the presence of acetaminophen, a compound considered as emerging pollutant in water supplies. Given the high content of polysaccharides in the Turia river water, we have evaluated the behavior of carbohydrates as THM precursors by interaction with chlorine (Chapter 4). The results indicate that although THM values generated in the reaction of chlorine with carbohydrates are minor compared to traditional models of humic and fulvic acids, in systems where there are high concentrations of these carbohydrates, they can contribute significantly to the formation of THMs.

Previous studies have provide a few examples showing that metal cations (i.e. Cu^{2+}) can act as promoters in the formation of THMs. Based on these precedents and taking into account the high concentration of other metal cations in natural waters we studied the influence of the presence of ions Ca^{2+} and Mg^{2+} in the formation of THMs, of selected model compounds and a sample from the Turia river water (Chapter 5). The results of this study indicate that the presence of these alkali-earth ions during the chlorination process greatly enhances the THMs formation.

Given the presence of emerging pollutants and the increasing use of alternative disinfectants we assessed the reactivity of β -lactam antibiotics (penicillin, amoxicillin and cefadroxil, Chapter 6) and amino acids (tryptophan, tyrosine and histidine, Chapter 7) against ClO_2 . The conclusion of the study is that ClO_2 is effective for the elimination of amoxicillin and cefadroxil treatment under typical conditions (pH 8, room temperature, diluted aqueous conditions) and inefficient to degrade penicillin under these conditions. Moreover, reaction product study under various conditions has allowed proposing a mechanism for the reaction of ClO_2 with selected antibiotics and amino acids, which agrees with the available data and reactivity of ClO_2 . Finally, it was found that ClO_2 pretreatment prior to chlorination is effective for THM reduction in solutions containing these types of compounds.

Finally, we have evaluated the disinfection effectiveness of a system based on a photocatalytic TiO_2 fiber for the disinfection of water contaminated with microorganisms resistant to chlorination (*Cryptosporidium Parvum* and *Giardia Lamblia*, Chapter 8). The

results show that the UV/TiO₂ system is effective to achieve complete disinfection of these protozoa working in real conditions of treatment. Chlorine plays a synergistic role in the system significantly reducing the exposure times needed to carry out the effective disinfection.

Anexo I

**Estancias en el extranjero,
congresos y publicaciones.**

Estancias en el extranjero

Centro. School of Applied Sciences. Centre for Water Science

Institución. Cranfield University

Supervisor. Simon Parsons

País. Reino Unido

Duración. 18 de Junio - 2 de Octubre 2009

Descripción. Reutilización de Aguas Residuales Urbanas. Estudio del impacto de la Desinfección (con cloro y cloraminas) y del pH en cuatro Tratamientos Biológicos (filtro biológico, reactor biológico aerobio de membranas, reactor biológico anaeróbico de membranas y flujo ascendente, reactor biológico anaeróbico de membranas y lodos en suspensión). Determinación de ácidos haloacéticos (HAAs), trihalometanos (THMs), haloacetoneitrilos (HANs) y cloropicrina (CP).

Congresos

1. Gozalvez, J.M., Sanz, D., Lora, J., León, M.C., Navalon, S. Estudio preliminar de ultrafiltración mediante membranas de bajo corte molecular como pretratamiento para la reutilización de un agua residual petroquímica. Congreso Iberoamericano en ciencia y tecnología de membranas (CITEM 07). Abstracts. Campina Grande (Brasil) 2007.
2. Lora, J., Sanz, D., Gozalvez, J.M., Santafe, M.A., Arnal, J.M.; León, M.C.; Navalon, S. Ultrafiltration and nanofiltration pre-treatment of reverse osmosis to reuse wastewater in a petrochemical industry. 1da World Congress on Desalination and water reuse. Abstracts. Maspalomas (Canarias, España). 2007.
3. Navalon, S., Alvaro, M. Garcia, H., Escrig, D., Costa, V. Photocatalytic treatment for water potabilization using "UBE" ceramic TiO₂ membranes. Póster. XXI IUPAC Symposium on Photochemistry. Kioto (Japón). 2006.
4. M. Alvaro, H. Garcia, L. Monforte, S. Navalon. Photochemical Treatment for Water Potabilization. Póster. XX IUPAC Symposium on Photochemistry. Granada (España). 2004.

Publicaciones

1. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: Product study of the reaction of three β -lactam antibiotics with ClO_2 . *Water Research*, Volume 42 (8-9), 2008, 1935-1942.
2. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl^- and Br^- on trihalomethane formation potential. *Water Research*, Volume 42 (14), 2008, 3990-4000.
3. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Chlorine dioxide reaction with selected amino acids in water. *Journal of Hazardous Materials* 164 (2-3), 2009, 1089-1097.
4. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro Hermenegildo Garcia, Daniel Escrig and Víctor Costa. Photocatalytic water disinfection of *Cryptosporidium Parvum* and *Giardia Lamblia* using a fibrous ceramic TiO_2 photocatalyst. *Water Science and Technology* 59 (4), 2009, 639-645.
5. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Ca^{2+} and Mg^{2+} present in hard waters enhance trihalomethane formation. *Journal of Hazardous Materials* 169 (1-3), 2009, 901-906.
6. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia, Isabel Alcaina. Analysis of dissolved organic matter from the Turia river. Combination of spectroscopy and derivatization by silylation (enviado a publicar 2010).

Otras publicaciones relacionadas

7. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Analysis of organic compounds in an urban wastewater treatment plant effluent (enviado a publicar 2010).
8. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia. Highly dealuminated Y zeolite as efficient adsorbent for the hydrophobic fraction from wastewater treatment plants effluents. *Journal of Hazardous Materials* 166 (1), 2009, 553-560.
9. Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia, Lorenzo Monforte. Photochemical treatment for water potabilization. Influence of wavelength and hydrogen peroxide concentration on the reduction of trihalomethanes. *Desalination and Water Treatment* 3 (2009) 21-28.

Anexo I

Recopilación de Artículos

Analysis of dissolved organic matter from the Turia river. Combination of spectroscopy and derivatization by silylation.

Sergio Navalon^a, Mercedes Alvaro^a, Isabel Alcaina^b, Hermenegildo Garcia^{*a}

^aDepartment of Chemistry, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022, Valencia (Spain)

^bChemical Engineering Department, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022, Valencia (Spain)

Abstract

Water concentrates from Turia river (1.5 mg L⁻¹ total organic carbon) obtained by nanofiltration (membrane mass cut-off 90 Da) were fractioned by non-ionic Amberlite resins (DAX8 and XAD4) to afford four samples termed as hydrophobic (50%), transphilic (24%), neutral (12%) and hydrophilic (14%). If a nanofiltration membrane 270 Da mass cut-off is used then about 50% of dissolved organic matter is not retained. These four fractions were characterized by analytical and spectroscopic techniques (FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS). Overall, these data are compatible with the presence of oligosaccharides, oligopeptides and fatty acids as the main components of dissolved organic matter. Particularly revealing was the information from MALDI-TOF-MS and ESI-MS/MS where series of compounds differing in the number of hexose units were identified. The four fractions have many spectroscopic similarities and, particularly the hydrophobic and transphilic ones, are really almost identical. This similarity in the fraction composition shows that the conventional fractioning procedure is inefficient as a standard

general method for separation of different compound types. The composition of dissolved organic matter was confirmed, and some individual organic compounds identified, by GC-MS analysis of the silylated derivatives obtained by reacting the fractions with a mixture of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (10 %). Thus, rather surprisingly, the dissolved organic matter of this natural raw water is predominantly composed by a relatively simple mixture of a few types of compounds with molecular weights well below 1,100 Da (about six hexose units). These results, particularly the absence of detectable amounts of high molecular weight humic acids and low molecular weight phenolic compounds indicates that trihalomethanes formed in the water disinfection process by chlorine really derive from oligosaccharides and oligopeptides. Also, our data suggests alternative strategies to effect a more efficient fractioning of the DOM.

Keywords: dissolved organic matter in water; fractioning of organic matter of natural water; carbohydrates in natural water; oligopeptides in natural water

*Corresponding author: Tel.:+34 96 387 7807; fax.: +34 96 387 78 09

E-mail address: hgarcia@qim.upv.es

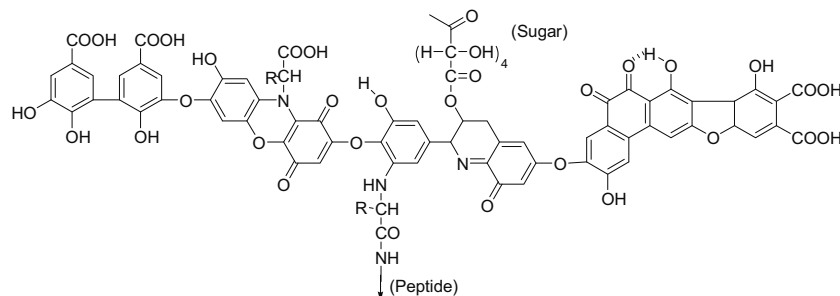
Introduction

There is an increasing social awareness about the importance of improving the sanitary, chemical and organoleptic quality of drinking water. A solid approach towards water quality improvement requires a deep understanding of the chemical composition of the natural hydric resources and the modification that this composition experiences upon treatment by disinfection agents (Bergamaschi et al. 2000; USEPA 1995). In this sense, also legal regulations (EU 1998; USEPA 1998) are being increasingly more strict about the presence in the drinking water of detectable amounts of undesirable and noxious compounds. Analysis of the natural hydric resources and determination of as many as possible components can serve not only to assess the suitability from the chemical point of view of the resource for human consumption, but also can be the basis of new strategies for water quality improvement (Owen et al. 1995). For instance, knowing the presence of certain compound types could eventually lead to develop procedures for their selective trapping and separation (Kammona et al. 2008).

In general, the organic matter present in natural resources plays an adverse effect on the water quality at least because upon chlorination organic compounds are precursors of trihalomethanes (THMs) and other chlorinated organic molecules (Bellar et al. 1974; Legube et al. 1985; Reckhow et al. 1990; Rook 1974). Chlorine is the mandatory disinfection agent to avoid microorganism proliferation and by reaction with the organic matter dissolved in the natural water forms THMs whose concentration should be below a legal limit (100 and 80 $\mu\text{g L}^{-1}$ in EU and USA, respectively).

It is generally accepted that the organic compounds present in natural waters are very complex molecules (Perdue and Gjessing 1990; Thurman 1985), some of them being commonly classified as humic and fulvic acids (Croué et al. 1993). Figure 1 shows the structural features of humic and fulvic acids (Buffle et al. 1977; Stevenson 1982).

Humic substances by Stevenson (Stevenson 1982)



Fulvic substances by Buffle (Buffle et al. 1977)

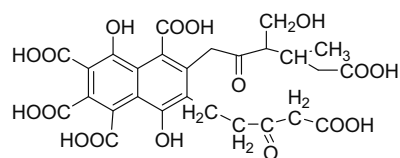


Figure 1. Structural features of humic and fulvic substances

In connexion with the chemical composition of the organic matter, there are also some general procedures to concentrate and separate the organic compounds into fractions. Basically, these procedures consist on the use of ultrafiltration (Buffle et al. 1978; Gjessing 1970), reverse osmosis (Gjessing et al. 1998; Oedegaard and Koottatep 1982; Serkiz and Perdue 1990), ion exchange resins (Bolto et al. 2002; Koelle 1984) and XAD resin adsorption (Aiken et al. 1979; Leenheer 1981; Thurman and Malcolm 1981).

In contrast to the widely accepted current paradigms about the composition and structural complexity of the organic matter in natural aquatic resources, herein we have performed an analytical study of the organic compounds present in the Turia river water. The Turia river (East of Spain) constitutes the raw water resource to supply drinking water for Valencia metropolitan area with an overall population of 1,500,000 consumers. In this study, we will report the almost complete absence in the Turia river water of humic and fulvic acids, the prevalent components being low molecular weight saccharides accompanied by oligopeptides and fatty acids. In addition, we will show that conventional procedures for water fractioning are far from optimum to separate

the components into chemically different fractions. Our study is relevant to illustrate the large differences of the Turia river water with respect to the widely accepted composition of aquatic resources described so far in characterization studies from different origin (Buffle et al. 1977; Christman 1979; Dragunov 1961; Leenheer et al. 1989; Leenheer et al. 1987; Rook 1976; Rook 1977; Schnitzer and Khan 1972; Stevenson 1982). The knowledge of the chemical composition can serve to gain understanding on the precursors of THMs and at long term could serve to improve drinking water quality based on strategies specifically designed for a particular natural resource. Although it is the data obtain only refers to a specific raw water, this type of studies expands the current knowledge on the composition of natural waters applied to complex mixtures.

MATERIALS

Amberlite resins, DAX8 and XAD4, were supplied by SUPELCO. These resins were exhaustively washed according the described standard method (Thurman and Malcolm 1981) until the resin did not leach detectable organic matter. All the solvents were of HPLC analytical grade.

Cation exchange resin (Purolite-C100) was supplied by Purolite International Ltd (Spain), and was exhaustively washed with Milli-Q water.

Membranes, NF90-2540 and NF270-2540, were supplied by Dow/Filmtec™. Membrane UF-1,000-XT-B2540 was supplied by Filtration Engineering Co. (USA).

Filters (Duofine II, 0.45 µm) were supplied by Pall Corporation.

Arabinose, fructose, galactose, ribose, ribonic acid, glucose, galactose, glyceric acid, fucose, talose, xylose, myo-inositol, 2-hydroxybenzoic acid, palmitic acid, stearic acid, thioacetic acid, 1,4-propanedioic acid, paracetamol, oxalic acid, malonic acid, nicotinamide, sarcosine, althronic acid, L-amino acids and N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 10% of trimethylchlorosilane (BSTFA + 10 % TMCS) were supplied by Sigma-Aldrich.

EXPERIMENTAL

Resin cleaning procedures

DAX8 and XAD4 resins were exhaustively washed according to the standard method (Thurman and Malcolm, 1981) until no leached organic matter from the resin was observed. To achieve this limit, the resins were firstly extracted with an aqueous basic solution (0.1 M, NaOH) until the filtered water DOC was less than 10 mg L^{-1} . Secondly, the resins were Soxhlet-extracted sequentially (24 h for each solvent) with methanol, diethyl ether, acetonitrile, and methanol. Thirdly, the resins were washed with Milli-Q water until free of methanol and the DOC of the washings were measured. The cleaning procedure was repeated until not DOC was detected. The washed resins were packed into glass columns and rinsed with NaOH (0.1 M) and HCl (0.1 M), three times in order to remove impurities due the manipulation. The last solution (0.1 M HCl) prepares the resin to retain adsorbates from the concentrate of the Turia river whose pH value is 2.

The cation exchange resin (Purolite-C100) was exhaustively washed by continuous recirculation of 50 L of deionized water through the packed resin at 2 L min^{-1} for 1 h. This procedure was repeated at least three times. At this moment a sample was taken and the DOC measured. The cleaning operation was repeated until not leached organic matter was detected by DOC measurement.

Cleaning of the nanofiltration unit

The procedure described below was applied for each individual membrane NF90-2540 or NF270-2540 installed in the nanofiltration plant.

First all the components (the selected membrane, resin cation exchange and Nylon filters) were installed in the nanofiltration facilities, then the reservoir tank of the plant (30 L) was filled with deionized water. The pump was switched on and the permeate flow was set at of 500 L h^{-1} and a pressure of 6 bars in order to clean all the components of the plant. The water from the permeate and the rejection outlets was recirculated to the 30 L reservoir for 1 h. Subsequently, the reservoir

was recharged with fresh deionised water and the procedure repeated at least three times. Subsequently, samples from the permeate and the rejection were analyzed, and the cleaning procedure of the plant repeated until not organic matter was detected by DOC measurement.

Sampling

The water under study was taken from the Turia river at the entrance of the water treatment plant “La Presa” (Valencia, Spain). 1,000 L of water were pumped from the river stream to a reservoir and transported to the University facilities. Upon receiving the sample, it was immediately filtered through polyester cartridges (Duofine II, 0.45 μm) to remove suspended particles. Besides, also bacteria and microorganism are retained in the filtration step. Subsequently Ca^{+2} and Mg^{+2} of the water were eliminated using a cation exchange resin (Purolite). This procedure replaces Ca^{2+} and Mg^{2+} and other metal ions by Na^+ . This step was found to be crucial to avoid precipitation of inorganic salts and membrane clogging in the subsequent steps. After an intermediate filtration through 0.45 μm filter, the sample (1,000 L) was submitted to concentration of the DOM using the nanofiltration unit

Nanofiltration

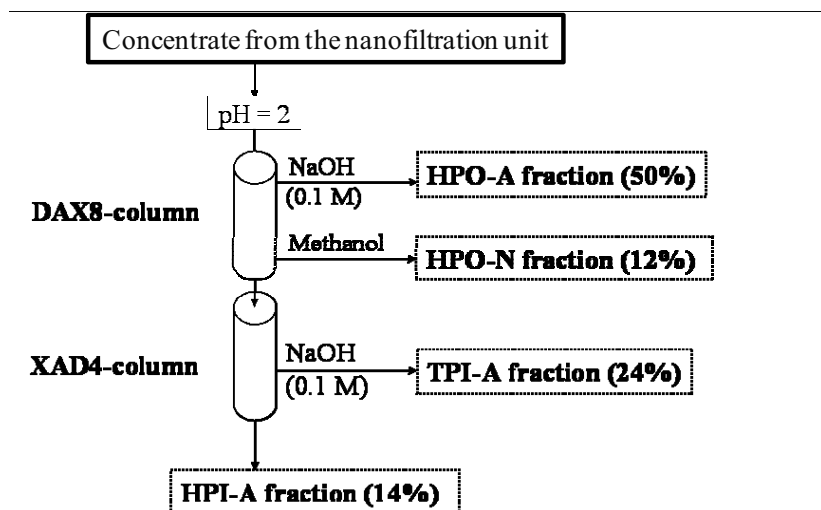
Concentration of the dissolved organic matter (DOM) was performed using a nanofiltration unit operating at 6 bars and a 90 Da cut-off mass polyamide membrane (Dow/Filmtec™). The plant operates in a kidney configuration in which the water to be concentrated is continuously circulated through the filtration unit while the permeate containing organic compounds of molecular mass below 90 Da was discharged. After several hours of operation in continuous loop, the initial volume (1,000 L) was reduced to 17 L while the DOM content of the raw water (1.5 mg L^{-1} TOC) was concentrated to 80 mg L^{-1} DOC, representing about 90 % of the initial carbon content. Other membranes with higher mass cut-off (1,000 and 270 Da) were used but the organic matter retained in the concentrate was significantly lower. When 270 Da mass cut-off membrane was used the

dissolved organic matter retained into the concentrated (17 L with 44 mg L⁻¹ DOC) corresponded only to 50 % of the initial DOC. This result indicates that a significant percentage of the components present in the Turia river sample are low molecular mass compounds and they are not retained by the membranes.

Fractioning

The most widely method for fractioning dissolved organic compounds in natural waters is the one that uses polymeric resins (DAX8 and XAD4) to retain the organic components according to their hydrophobic/hydrophilic and acid/base properties (Thurman and Malcolm, 1981).

Basically, the process consisted in the following steps. First, the concentrate of the nanofiltration was acidified to pH 2 with 0.1M HCl and the solution passed through Amberlite DAX8 resin. Desorption with 0.1M NaOH in Milli-Q water of the organic matter adsorbed under acid pH on Amberlite DAX8 renders a fraction termed as hydrophobic (HPO-A) that accounts for about 50% of DOC. This HPO-A fraction is the most important one in terms of the percentage of the organic matter. After NaOH desorption, the Amberlite DAX8 was flushed with methanol to recover those adsorbates that do not elute with aqueous NaOH. The fraction retained in the DAX8 and recovered with methanol was termed as neutral (HPO-N) according to the Malcolm and Thurman terminology (Thurman and Malcolm, 1981). The eluate from DAX8 containing the compounds that are not retained in this column was subsequently passed through Amberlite XAD4. The effluent from this XAD4 was termed as hydrophilic (HPI-A). The adsorbate on Amberlite XAD4 was desorbed with 0.1 M NaOH in Milli-Q water and constitutes the fraction termed as transphilic (TPI-A). Scheme 1 illustrates the adsorption-desorption procedure, the resins used and the codes for the fractions obtained.



Scheme 1. Fractioning procedure employed for the Turia river water concentrate.

HPO-N fraction initially dissolved in methanol was concentrated under vacuum at 40 °C and the residue redissolved in Milli-Q water. All fractions in aqueous solution were acidified to pH 2 with HCl (0.1 M) and were contacted with the anion exchange resin IRN-78 to exchange by –OH all the anions present in the concentrate (mainly HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- and NO_3^-) that later interfere in the subsequent characterization of organic compounds. After removal the inorganic anions, the suspensions of the resin in aqueous solutions containing the different fractions were filtered and the aqueous solutions were concentrated under vacuum at 40 °C and finally lyophilized.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis

For product identification, the isolated fractions were acidified to pH 2 with HCl, concentrated at 40 °C and lyophilized. The residues were suspended in 0.5 ml of N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (BSTFA+ 10% TMCS) and the solution stirred at 80 °C for 8 h. The resulting silylated mixture was dissolved in anhydrous acetonitrile, filtered through a 0.45 μm membrane, and injected in a GC-MS (Hewlett Packard HP6890 Chromatograph and mass detector Agilent 5973). The capillary column (30 m) contains

crosslinked (5%) phenylmethylsilicone (HP-5MS) as stationary phase. Helium was used as a carrier gas (1.2 mL min⁻¹). The injection volume was 1 μL (splitless mode). The injection and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively. The oven temperature program starts at 50 °C for 3 min, then the temperature increases at a rate of 8 °C/min up to 90 °C, maintains this temperature for 2 min, and subsequently rises again at a rate of 15 °C/min up to 280 °C for 10 min.

Product identification was done based on the mass spectra of the silylated derivative present in the reaction mixture by comparing them with authentic samples of silyl derivatives or with the library data (NIST98). Quantification was made by means of external standards (21 L-amino acids or nitrobenzene).

NMR spectroscopy

Liquid state ¹H-NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 3000, 300 MHz for ¹H, using CH₃OH as reference. For ¹H-NMR spectroscopy, the samples were dissolved in deuterated methanol or in deuterated water containing deuterated sodium hydroxide. The two spectra sets in both solvents were indistinguishable. Solid state MAS ¹³C-NMR were recorded on a Varian Inova-750 MHz.

Infrared spectroscopy

Fourier transformed infrared (FT-IR) spectra were recorded for ambient equilibrated samples using a Jasco FT-IR-460 PLUS spectrophotometer. Solid residues corresponding to each fraction were mixed with anhydrous KBr powder and pressed to 10 Ton for 5 min to obtain a pellet. Prior to record the FT-IR spectra the samples were dried at 40 °C for 24 h.

MALDI-TOF-MS

Matrix assisted laser desorption ionisation coupled by time of flight mass spectrometry spectra (MALDI-TOF-MS) were performed in a Reflex IV (Bruker) mass spectrometer, with ionization and desorption by a nitrogen laser assisted by dithranol matrix and using time of flight detector. Experiments were carried out in reflector mode. The averaged number of shots was 150. Digitizer delay was 26 000 ns and the voltage polarity was positive.

Tandem ESI/MS/MS

Direct-injection electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-APCI-MS) and tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) were performed using a Bruker Esquire 3000 plus Ion Trap LC/MS(n) system (Bruker Daltonik, Germany). The Esquire 3000 was equipped with an ESI source. The analyses were carried out both in positive and negative modes. Mass spectra were acquired over the scan range m/z 100-1400 m/z . The He nebulizer gas pressure, the drying gas flow, the capillary voltage and the vaporizer temperature were set at 7 psi, 6 L min^{-1} , 4000 V and 300 °C, respectively.

Analysis of analysis

The amino acid content of the individual fractions was determined using reverse-phase HPLC (Waters 600 Series adapted to a photodiode array detector) under gradient conditions with precolumn phenylisothiocyanate (PITC) derivatization (Dress et al. 1997) precolumn, and a Kromasil-C18 column.

The precolumn derivatization reagent consisted in a mixture of ethanol, water, triethylamine and PITC (proportions 7:1:1:1, in volume) freshly mixed before each reaction to prevent reagent aging.

Oligopeptide hydrolysis for amino acid analysis was carried out mixing the sample (15 mg) with 2 ml of HCl (6 M) at 110 °C for 24 h. After this time, the pH of the sample was set to 10 units

with NaOH (2 M) and water was evaporated under vacuum at low temperature (40 °C). Subsequently, 40 µL of the PITC derivatization mixture was added to the sample. The reaction was carried out at room temperature for 40 min and again dried under vacuum. Finally, the sample was re-dissolved using 1 ml of solvent A (see next paragraph), filtered through a 0.45 µm filter and immediately injected in the HPLC for analysis.

The eluents for HPLC consisted in a mixture of two solvents (A and B). Solvent A was an aqueous buffer prepared with 0.14 M sodium acetate with 0.5 ml L⁻¹ of solution named C. Solution C was composed by a mixture of ethanol-water-triethylamine in a proportion 2:2:1 in volume titrated to pH 6.3 with glacial acetic acid. Solvent B consisted of 60% acetonitrile in water. The gradient was linear beginning at 90% A/10 % B and going to up to 50% A/50 % B from 0 to 45 min. The gradient continued to 100 % B between 45 and 50 min, remaining to 100 % B from 50 to 55 min and returning to 90 % A/10 % B from 55 to 60 min. The flow was 0.9 mL min⁻¹ and the injection volume was 200 µL. This method has an amino acid detection limit of nanograms.

Quantification of the amino acids was carried out using authentic samples of amino acids under the conditions described above.

Combustion elemental analysis

Elemental analyses were carried out with a Perkin Elmer CHNOS analyser. Calibration was made by adding benzenesulfonylamide, standard of known composition every five samples.

Analysis of organic carbon

Total organic carbon (TOC) was analysed using a High-TOC Elementar II analyzer. For DOC determination, the sample was filtered through a Nylon 0.45 µm filter. The measurements are based on the Pt-catalyzed total combustion of organic matter in water at 950 °C and IR detection and quantification of the evolved CO₂.

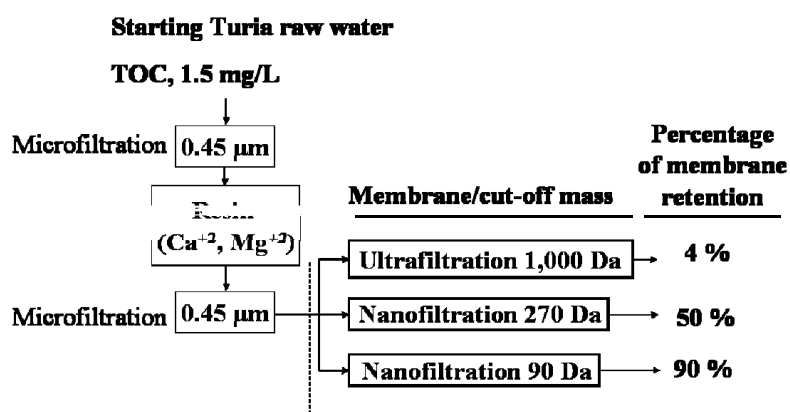
Hydrolysis of the fractions

Samples were hydrolyzed using the method previously described to hydrolyze organic matter (Hänninen and Niemelä 1992). A weighed sample (25 mg) was dissolved in 4 ml of NaOH (2 M) and autoclaved at 170 °C for 3 h under nitrogen atmosphere.

RESULTS AND DISCUSSION

Concentration of dissolved organic matter

Scheme 2 depicts the steps followed for concentration of the DOM from the Turia river (see experimental) and the percentage of dissolved organic carbon (DOC) retained as a function of the mass cut off of the membranes.



Scheme 2. DOM concentration using a membrane plant. Water samples were taken in the period June - July 2006.

Initially, a membrane with a mass cut-off number of 1,000 Da was used (Scheme 2), but unexpectedly this membrane only led to a minor DOC concentration. This indicates that most of the organic matter of the Turia river has a molecular weight below 1,000 Da. This fact clearly rules out the presence of humic and fulvic acids whose molecular weights are greater than 1,000 Da. Then, in order to increase DOC retention we used the same methodology but employing a nanofiltration

membrane with a mass cut-off number of 270 Da (Scheme 2). The use of this nanofiltration membrane leads to an increase in the DOC from 4 % to 50 %. This value also indicates that with a cut-off mass of 270 Da a significant percentage of the DOC (about 50 %) goes through the membrane (permeate) and is not retained in the concentrate.

In order to achieve a more efficient concentration of the organic matter without discriminating the low molecular weight components, it was necessary to use a membrane with a mass cut-off number of 90 Da (Scheme 2). This mass cut-off corresponds to the smallest molecular mass cut-off membrane that can be implemented in our nanofiltration system. Working under these conditions and based on the initial DOM value, about 90 % of DOC present in the raw water could be finally retained in the concentrate, while the volume was reduced from 1,000 L to 17 L. Scheme 2 summarises the results obtained for the three membranes depending on the mass cut-off. Overall, the results obtained with the different membranes clearly indicate that the DOM of this natural resource has low molecular weight, about 50 % being in the range between 270 and 90 Da. This excludes high molecular weight humic or fulvic acids as the predominant components of the organic matter.

Fractioning of concentrated organic matter

After 50-fold concentration of the Turia river water organic matter by nanofiltration, the concentrate was submitted to fractioning following the conventional procedure described by Thurman and Malcolm (Thurman and Malcolm 1981) (see experimental). Table 1 summarises the four fractions obtained their origin and their percentage respect to the initial DOC. HPO-A fraction is the most important in terms of DOC followed by TPI-A, HPI-A and HPO-N.

Table 1. Name, recovery procedure and percentage of initial DOC for the fractions obtained in the fractioning process

Fraction	Column	Elution	Initial DOC percentage (%)
Hydrophobic (HPO-A)	Retained in DAX8	First adsorbed, then eluted with NaOH (0.1 M)	50
Neutral (HPO-N)	Retained in DAX8	First adsorbed Second not eluted with NaOH Third eluted with MeOH	12
Transphilic (TPI-A)	Not retained in DAX8 Retained in XAD4	First not adsorbed in DAX8 Second adsorbed in XAD4 Third eluted with NaOH (0.1 M).	24
Hydrophilic (HPI-A)	Not retained in DAX8 or XAD4	Not adsorbed in DAX8 or XAD4. Concentrated under vacuum at low temperature (40 °C)	14

As Table 1 shows, we have followed recommended protocols to proceed to fractioning of the organic material present in the concentrate from Turia river (Leenheer 1981; Thurman and Malcolm 1981). The results discussed later indicate that conventional procedures for fractioning organic matter are unsatisfactory to achieve a clean separation of the organic matter present in the Turia river. This conclusion will be highlighted after discussing the characterization details for the different fractions. In this way and according to Table 1 we have ended up with four fractions, that even though they were denoted in the literature with names such as hydrophobic (HPO-A), neutral (HPO-N), transphilic (TPI-A) and hydrophilic (HPI-A), in reality they exhibit very similar spectroscopic features (see below). Even, GC analysis after derivatization shows similar product distribution (see below). Thus, for the sake of brevity and due to the similarity among them, the spectroscopic data of the four fractions will be jointly commented.

For all the fractions, we have recorded liquid ^1H - and solid state ^{13}C -NMR spectra as well as FT-IR spectra, elemental analysis (carbon, nitrogen, hydrogen and sulphur) and mass spectra (ESI-MS, ESI-MS/MS and MALDI-TOF-MS) of the samples equilibrated at the ambient. Also very informative mass spectra after derivatization of the samples by silylation have been performed with

and without prior hydrolysis of the samples. Finally, acid hydrolysis was performed to determine the amino acid content in each fraction.

Elemental analysis

Combustion chemical analysis of the samples allows to determine the percentage of C, N, H and S. The results are given in Table 2. Besides variations in the percentage, the most salient features are the large amount of oxygen and the presence of significant amounts of nitrogen and sulfur. Typical nitrogen compounds are amino sugars, peptides and nitrogenated bases. With respect to sulfur, it seems more reasonable that a high percentage of this element would correspond to sulfonates and sulfonic acid detergents from anthropogenic origin. Additionally, part of this sulphur content could correspond to sulphur amino acids and peptide derivatives

	weight %				Molar atomic ratio		
	N	C	H	S	N/C	H/C	S/C
HPO-A	0.99	21.53	2.62	0.22	0.039	1.458	0.004
TPI-A	0.23	14.58	2.08	0.09	0.013	1.715	0.002
HPO-N	0.45	17.66	2.29	0.27	0.022	1.558	0.006
HPI-A	0.65	19.34	2.40	0.87	0.029	1.488	0.017

It has to be noted that the ratio H/C of humic substances, which possess a high content of aromatic units, is around 1.0 (Huizhong and Herbert, 2001). Moreover the H/C molar ratio of saccharides is around 2. The experimental results of the four fractions from Turia river give values between these two limits. Respect to the ratio N/C the common values for humic and fulvic acids are around 0.03 and 0.01, respectively.

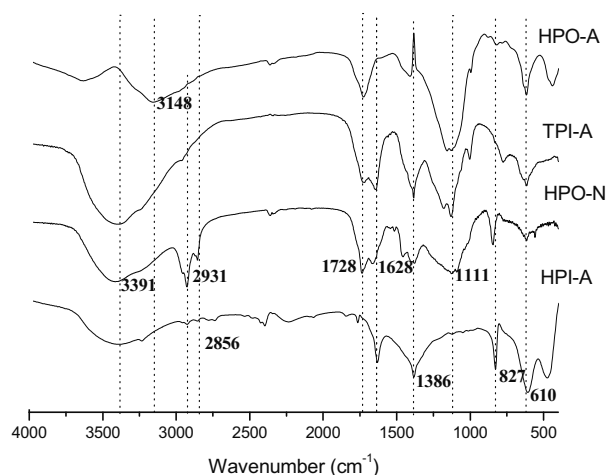
Spectroscopy study

FT-IR spectra of the four fractions were recorded at room temperature and under ambient conditions. Prior to recording the FT-IR spectra the samples were dried in an oven at 50 °C. Figure 2 shows the FT-IR spectra obtained from each of the four fractions. In this Figure, relevant

wavenumbers (cm^{-1}) have been marked. As it can be seen there, the four spectra show similarities (presence of $-\text{OH}$ and $\text{C}=\text{O}$ groups) and differences. Moreover, a closer look to some regions of the spectra (see for instance from 1,800 to 1,600 cm^{-1}) clearly show a gradual variation of the spectroscopic features.

Thus, for instance while the HPO-A fraction has mainly a carboxyl group at 1,728 cm^{-1} , this peak is also present in the HPO-N and TPI-A fractions accompanied by other bands at around 1,645 cm^{-1} . Considering the complexity of the mixture present in natural water and the stationary phase of the acrylic ester (Amberlite DAX8) and poly(styrene-co-divinylbenzene) (Amberlite XAD-4) resins, it is not reasonable to expect a more efficient fractioning. Overall the general features of the IR spectra of HPO-A, TPI-A and HPO-N are: all the fractions have: 1) OH vibrations from 3,700 cm^{-1} to 2,500 cm^{-1} ; 2) $\text{C}=\text{O}$, stretching vibration; and 3) C-O stretching vibrations at about 1,200-1,000 cm^{-1} . Concerning the OH groups, some significant differences in the shape and position of the bands were observed. Except for HPI-A, these OH bands cannot be attributed entirely to absorbed water present in the samples since besides the OH groups in the 3,600-3,000 cm^{-1} region the other accompanying band of water at 1,620 cm^{-1} is not observed or is very weak in comparison to the OH band in the 3,500-2,500 cm^{-1} . Therefore, except for HPI-A, the $-\text{OH}$ stretching bands observed in the FT-IR spectra are most likely due to the hydroxyl groups present in the organic molecules forming part of the DOM.

Figure 2. FT-IR spectra of the different concentrates and fractions isolated from Turia river

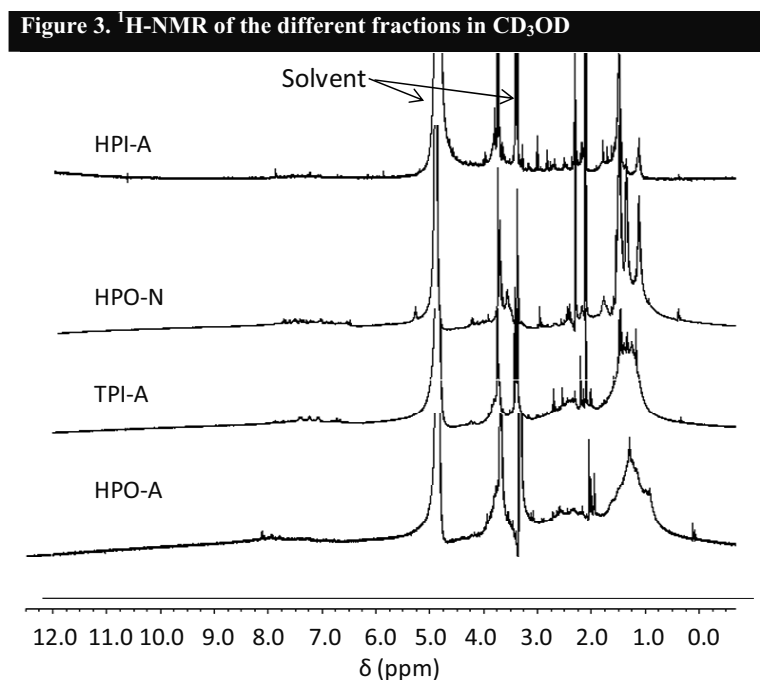


Concerning the C=O vibration bands two different peaks appearing at about $1,728\text{ cm}^{-1}$ and $1,628\text{ cm}^{-1}$ can be assigned to carboxylic and amide C=O groups, respectively. As it can be seen in Figure 2 HPO-A., TPI-A and HPO-N fractions show predominantly bands of carboxylic groups, while the amide is clearly observable in the TPI-A and HPO-N fractions. Concerning the C-O single bond stretching appearing around $1,150\text{ cm}^{-1}$, they are present in the HPO-A, TPI-A and the HPO-N fractions. Table 3 summarizes the most salient information derived from the FT-IR spectra of the four fractions from the Turia river concentrated.

Tabla 3. IR summary of the different fractions

Fraccion	Functional group		
	OH	C=O	C-O
HPO-A	carboxylic acid	carboxylic	very intense
TPI-A	carboxylic acid	carboxylic and amide	intense
HPO-N	alcohol	carboxylic and amide	medium
HPI-A	not intense	absent	absent

In order to get more information about the type of compounds present in each fraction, we also recorded $^1\text{H-NMR}$ spectra of the fractions in perdeuterated methanol solution (Figure 3). From these spectra, it became clear that the amount of aromatic protons is very minor with respect to the aliphatic hydrogens. The percentage of aromatic protons in humic substances is around 18 %, conversely in the HPO-A fraction from the Turia river, where supposedly humic substances should appear, has barely 1% of aromatic protons. In addition, phenolic protons should appear at chemical shifts below 7 ppm while in our case the aromatic protons appear clearly above 7 ppm.



In contrast, the region from 3 to 4 ppm corresponding to hydrogens bonded to carbons next to oxygen atoms shows large signals. In this region, sharp peaks were observed on top of a broad background. These sharp signals can be assigned to $-\text{OCH}_3$, while the broad signals are most likely attributable to coupled H-C-O protons forming part of cyclic compounds.

$^1\text{H-NMR}$ spectra also shows signals in the 2.6 to 2 ppm. These peaks are attributable to hydrogens in α -position to C=O or unsaturated C-C bonds. As commented before, the sharp singlets

between 1.8 and 2.0 ppm indicate the presence of methyl groups bonded to C=O or C=C in these positions. Finally, the signals between 1.5 and 0.8 ppm are assigned to aliphatic hydrogens. A summary of the peak assignments and integral of the peak areas for each of the fractions are contained in Table 4.

Overall the $^1\text{H-NMR}$ shows a minor percentage of aromatic hydrogen, the presence of important concentration of hydrogen bonded to C-O hydrogens, in α -position to C=O or $-\text{C}=\text{C}$ - and aliphatic chains. Methyl groups are observed for each type of signals. The proportion between these three types of hydrogen varies somewhat depending on the fraction.

Table 4. Proportion of non-exchangeable hydrogens as determined from $^1\text{H-NMR}$ of the fractions and their assignment

δ (ppm)	Assignment	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
		Relative percentage (%)			
0.5-1.9	aliphatic	33.4	52.1	61.0	28.4
1.9-3.1	neighbor to unsaturated groups	29.4	25.0	14.0	28.1
3.1-4.6.0	HC-O	36.1	17.2	15.2	39.8
4.7-6.0	acetal	0.0	1.0	2.4	0.3
6.0-9.0	aromatic	1.0	5.7	7.3	3.7

The above conclusions are compatible with the solid-state MAS $^{13}\text{C-NMR}$. Figure 4 shows representative $^{13}\text{C-NMR}$ of the four fractions. In this Figure, the chemical shifts of relevant signals have been marked. As it can be seen there, the presence of carboxylate groups (172 ppm), carbons bonded to oxygen (71 and 52 ppm) and aliphatic carbons (22 ppm) is clearly visible. Concerning aromatic carbons, spinning side band from the carboxylate peak appears in this region and they have been indicated with an asterisk. The spinning side bands have been confirmed by recording additional $^{13}\text{C-NMR}$ at different spinning rates. Some of the fractions show a peak at 123 ppm that is not due to spinning band and is attributable to aromatic rings. But as commented previously for solution $^1\text{H-NMR}$, this band is minor compared as for instance the carboxylate signal. Alternatively the band at 123 ppm could also be assigned to olefinic C=C double bonds.

Figure 4. Solid state ^{13}C -NMR spectra of the four fractions from the Turia river. The asterisks indicate spinning side bands confirmed by recording the spectra at different spinning frequencies.

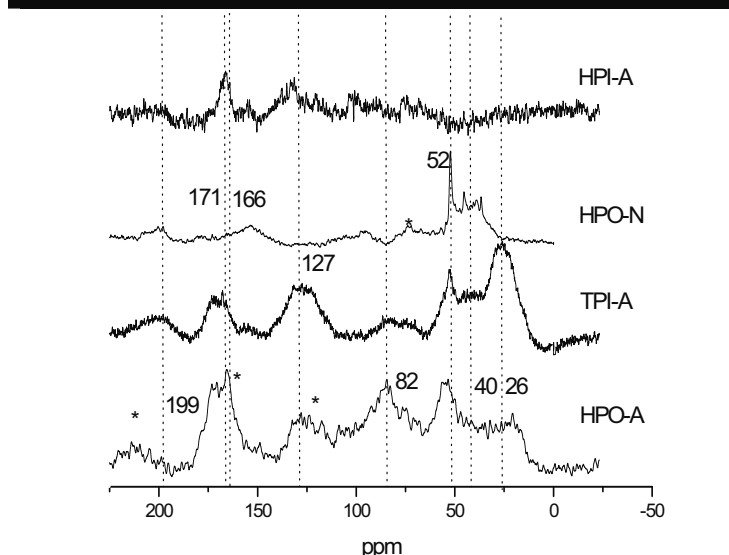


Table 5 shows the assignment of different regions from the ^{13}C -NMR spectrum for each fraction and the relative percentage of every region.

Table 5. Types of carbon recorded in solid-state ^{13}C -NMR for each of the fractions obtained from the Turia river.

δ (ppm) range	Assignment	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
		Relative intensity (%)			
0-47	aliphatic	1.9	27.5	39.9	4.1
47-90	heteroatom	41.5	30.3	16.5	13.8
90-108	O-C-O	8.5	0.3	4.1	12.7
108-145	aromatic or olephinic	2.8	25.3	17.3	38.3
145-167	C_aromatic-O,N	19.2	8.8	5.8	27.8
167-187	(C=O)-X-	14.4	6.9	11.6	1.3
187-220	ketone, aldehyde	11.8	0.8	4.8	2.0

Analysis of the organic compounds by derivatization

The previous general comments on the FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of the four fractions give useful information about the type of compounds present in the raw water, but give no indication of the actual compounds and their percentages. In order to identify individual compounds, we proceeded to perform derivatization by silylation of each fraction and injected the mixture on a GC-MS. Comparison of the acquired mass spectra (MS) of the trimethylsilyl (TMS) derivatives with those of a MS library (NIST98) gives the first clue about the identity of the individual components in each fraction. To confirm the proposed structure suggested by MS comparison, authentic samples, when commercially available, were submitted to silylation under the same conditions, and injected in the GC-MS. Tables 6-9, show the structure of proposed components in the mixture, distinguishing the cases in where secure identification was made by comparison of the retention time and MS with authentic samples and those others in which the proposed structure is based exclusively on the comparison with the MS library. In the last case, the matching quality (MQ) in percentage is indicated.

Inspection of the structures shown in the Tables indicates that the fractioning procedure is not perfect and there are common compounds in several fractions, although there are some characteristic trends distinctive of the different fractions. Thus, the fraction denoted as HPO-A contains mainly polyhydroxylic compounds mostly with monosaccharide structure. The list includes pentoses (arabinose, fructose, ribose, xylose), hexoses (galactose, glucose, talose) in various open and hemiketalic form. In addition, some α -methoxy monosaccharides were characterized. In addition, of polyhydroxy compounds, fatty acids, monoglycerides and short chain carboxylic acids were also observed.

In contrast, to the composition of the HPO-A fraction composed predominantly by monosaccharides, the TPI-A fraction is predominantly composed by carboxylic acids either with long alkyl chain (fatty acids) or with other functional groups besides -COOH. As a general comment, it appears that due to the presence of the carboxylic groups it can be accepted that the

polarity of the TPI-A fraction is higher than that denoted as HPO-A, where the main components are alcohols. In this regard, the carboxylic acid group present in many compounds characterized in the TPI-A fraction makes understandable the terms used to denote the fractions even though all of them exhibit obviously affinity for water. These carboxylic acids present in the TPI-A fraction are those that would be responsible of the stretching band in the IR from 3,500 to 2,800 cm^{-1} as well as the peak at 172 ppm in ^{13}C -NMR spectroscopy and the protons from 2.8 to 1.9 ppm in the ^1H -NMR spectrum.

The percentage of individual compounds identified by GC-MS after silylation for the HPO-N and HPI-A fractions was much lower (Tables 8 and 9). In the case of HPO-N fraction these products are free fatty acids accompanied by monoglycerides (Table 8). Importantly, it has been detected paracetamol indicating anthropogenic pollution. We will come back later to the composition of this HPO-N fraction when commenting the products observed upon derivatization of the hydrolyzate mixture. A similar situation, i.e. low percentage of volatile TMS derivatives observed by GC-MS upon silylation occurs also for the HPI-A fraction where oxalic and malonic acids were the only detected compounds (Table 9).

Overall, the product distribution shown in Tables 6 - 9 is consistent with the mass cut-off of the nanofiltration membrane used to concentrate the Turia river water, and the relatively low molecular weight of many of the identified products. As indicated before using a membrane with 270 Da mass cut-off, 50 % DOM was not retained in the concentrate, indicating that unexpectedly there is a large percentage of low molecular weight compounds.

Table 6. Characterized and proposed compounds detected by GC-MS upon silylation of the HPO-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.







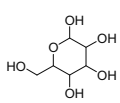
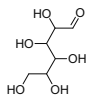
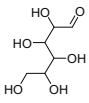
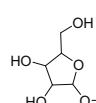
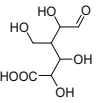
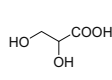


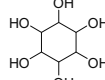
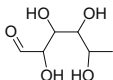
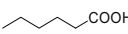
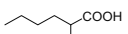

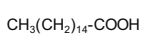
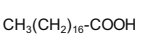



					
arabinose (8.8)	fructose (7.3)	galactofuranose (6.3)	ribose (6.6)	ribonic acid lactone (13.6)	glucopyranose (6.2)
					
galactopyranose (4.6)	glucose (3.5)	galactose (4.6)	tetrahydro-2-(hydroxymethyl)- 5-methoxyfuran-3,4-diol (MQ, 87) (0.9)	glucuronic acid (MQ, 89) (1.3)	
					
glyceric acid (1.1)	talose (28.1)	xylopyranose (5.7)	myo-inositol (9.7)	fucose (11.5)	
					
hexanoic acid (0.2)	2-ethylhexanoic acid (1.1)	2-hydroxybenzoic acid (1.5)	palmitic acid (3.7)	stearic acid (4.5)	
					
tetrahydro-2-methoxy-2H- pyran-3,4,5-triol (MQ, 86) (3.2)	2,3,4,5-tetrahydroxyhexanal (MQ, 82) (2.4)	tetrahydro-2-(hydroxymethyl)-6- methoxy-2H-pyran-3,4,5-triol (MQ, 90) (1.7)			
Total identified: 138.1 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of sample					

Table 7. Characterized and proposed compounds detected by GC-MS upon silylation of the TPI-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.

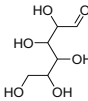
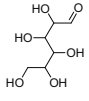
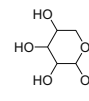
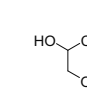
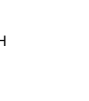





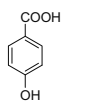
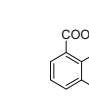
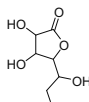
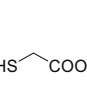
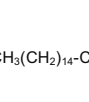
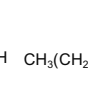
				
talose (28.1)	glucose (2.3)	xylopiranose (5.7)	glyceric acid (1.1)	butane-1,2,4-triol (MQ, 96) (0.4)
				
2-hydroxysuccinic acid (MQ, 92) (2.2)	2-hydroxymethyl butanoic acid (MQ, 83) (0.4)	succinic acid (MQ, 91) (3.0)	3,3-dimethyl pentanedioic acid (MQ, 97) (5.3)	3-hydroxypentanoic acid (MQ, 84) (2.3)
				
4-hydroxybenzoic acid (2.7)	2-hydroxy-2-methyl benzoic acid (MQ, 81) (1.3)	alltronic acid (MQ, 91) (0.8)	thioacetic acid (MQ, 91) (0.8)	stearic acid (6.2)
				
				palmitic acid (4.3)
Total identified: 69.2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of sample				

Table 8. Characterized and proposed compounds detected by GC-MS upon silylation of the HPO-N fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.

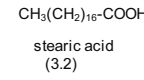
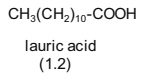
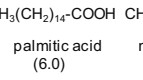
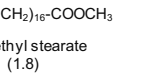
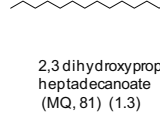
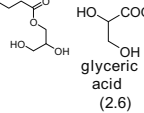
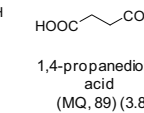
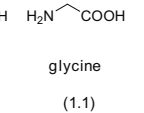
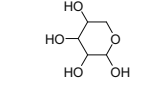
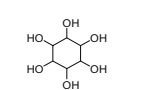
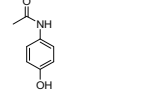
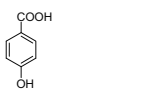
			
stearic acid (3.2)	lauric acid (1.2)	palmitic acid (6.0)	methyl stearate (1.8)
			
2,3-dihydroxypropyl heptadecanoate (MQ, 81) (1.3)	glyceric acid (2.6)	1,4-propanedioic acid (MQ, 89) (3.8)	glycine (1.1)
			
xylopyranose (0.3)	myo-inositol (0.2)	paracetamol (4.8)	4-hydroxybenzoic acid (0.1)
Total identified : 26.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of sample			

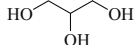
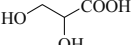
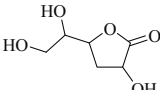
Table 9. Characterized and proposed compounds detected by GC-MS upon silylation of the HPI-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture.	
$\text{HOOC}-\text{COOH}$ oxalic acid (0.8)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ malonic acid (MQ, 87) (0.8)
Total identificado: $1.6 \mu\text{g mg}^{-1}$	

Analysis of the organic compounds by hydrolysis followed by derivatization

The above GC-MS study of the fractions after silylation has allowed identification of large number monosaccharides, carboxylic acids, carboxylic esters and a few aromatic compounds. However, this study can be disguised by the fact that, even after silylation, there could be some components lacking the sufficient volatility to be analyzed by GC. Apparently, this problem is more acute in the HPO-N and HPI-A fractions for which percentage in mass of the products characterized, 2.6 and 0.16 %, respectively is relatively small (see Tables 8 and 9). In order to deal with this problem, we proceeded to saponification of known amounts of the fractions followed by silylation and analysis by GC-MS. The rationale behind saponification is to hydrolyse high molecular weight organic compounds into their simpler components. Thus, after hydrolysis the resulting products would have low molecular mass and, therefore the chances to be analysed by GC should be higher. In addition, comparison between chromatograms before and after hydrolysis should give a better idea of the real composition of each fraction.







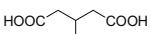
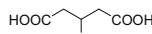
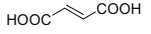

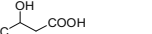
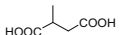
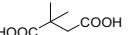
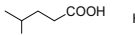
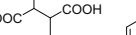
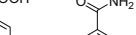







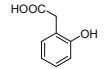
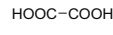
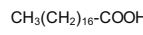
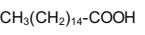
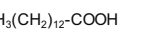

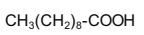
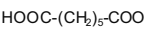
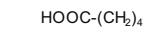
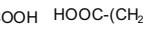
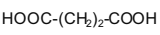
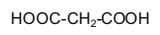
Hydrolysis under strong basic conditions was carried out in autoclave at 170 °C for 3 h using NaOH (2 M) under nitrogen atmosphere. Under these conditions most ester, peptidic and glycoside bonds are hydrolyzed into carboxylic acids, amino acids and monosaccharides. The most important feature of the basic treatment is that saccharides are not stable under these conditions. A blank control with pure glucose as model followed by silylation and GC analysis clearly shows the total decomposition of glucose with this basic treatment (see Table 10). Therefore, although monosaccharide decomposition will simplify the mixture after basic treatment caution has to be

taken when interpreting the results of the analysis after hydrolysis considering the possibility of some chemical decomposition beyond the desired hydrolysis of esters, amides and glycosides.

Tabla 10. Productos obtenidos tras hidrólisis de la glucosa.		
		
glicerol	ácido 2,3-dihidroxiopropanoico	dihidro-3-hidroxi-5-(1,2-dihidroxi-etil) furano-2(3H)ona
		mezcla de estereoisómeros

Tables 11-14 show the products identified in the hydrolizate and their corresponding percentage. From these tables it can be concluded that after hydrolysis the GC-MS analysis of the TMS derivatives results in the detection of aliphatic and aromatic carboxylic acids such as aromatic as well as hydroxy acids and diacids. Importantly, according to the objective pursued in the basic hydrolysis, the percentage of the products detected tested was significantly higher than that without prior basic hydrolysis. However, considering the glucose decomposition test after hydrolytic treatment, it could be that the products identified arise from the transformation of parent compounds present originally in the fractions.

Table 11. Products characterized from the hydrolysis of the HPO-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.

					
glycine (6.6)	alanine (0.8)	2-hydroxypropanoic acid (MQ, 82) (14.8)	2-hydroxypentanoic acid (MQ, 86) (1.7)	2-methylpropanoic acid (MQ, 91) (1.1)	2-ethylpropanedioic acid (MQ, 82) (19.9)
					
3-hydroxypentanedioic acid (MQ, 87) (5.5)	1,3,5-tricarboxylic propane (MQ, 91) (9.4)	trans-butenedioic acid (MQ, 93) (2.8)	Hydroxybutenedioic acid (MQ, 85) (40.0)	trans-methylbutenedioic acid (MQ, 87) (11.8)	
					
methylbutanedioic acid (MQ, 89) (4.9)	2,2-dimethylbutanedioic acid (MQ, 84) (11.3)	4-hydroxypentanoic acid (MQ, 89) (1.1)	1,2-dimethylbutanedioic acid (MQ, 87) (2.1)	Benzoic acid (1.9)	nicotinamide (2.6)
					
2-hydroxybenzoic acid (3.9)	3-carboxypyridine (MQ, 86) (5.3)	1,2-benzenedioic acid (MQ, 84) (3.7)	1,3-benzenedioic acid (MQ, 91) (5.3)	2-methylbenzoic acid (MQ, 86) (2.2)	4-hydroxybenzoic acid (2.3)
					
1-(2-hydroxyphenyl)acetic acid (MQ, 81) (2.9)	ethanedioic acid (10.9)	stearic acid (7.6)	palmitic acid (11.7)	myristic acid (7.4)	1-(4-hydroxyphenyl)ethanone (MQ, 83) (9.8)
					
decanoic acid (MQ, 91) (1.0)	heptanedioic acid (MQ, 87) (5.9)	hexanedioic acid (MQ, 85) (7.8)	pentanedioic acid (MQ, 93) (9.2)		
					
butanedioic acid (MQ, 87) (49.5)	propanedioic acid (2.3)				

Total identified: 287.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ of sample

Table 12. Products characterized from the hydrolysis of the TPI-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.

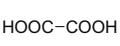
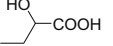
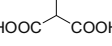
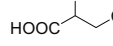
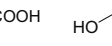
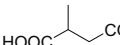
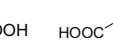

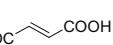
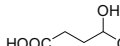

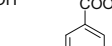
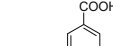
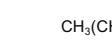
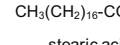

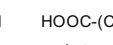
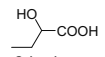
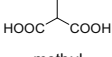
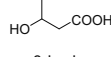
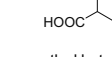
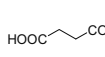
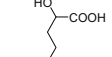
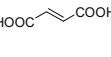
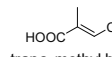
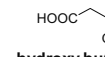
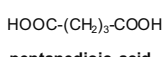
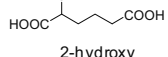
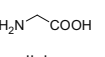
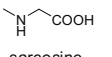
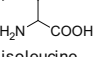
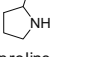
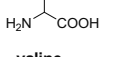
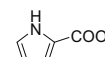
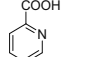
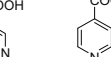
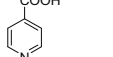
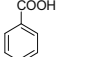
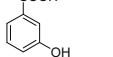
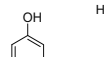
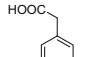
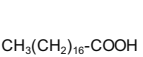
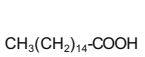
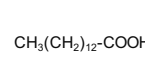
				
ethanedioic acid (2.7)	2-hydroxybutanoic acid (MQ, 87) (1.4)	2-ethylpropanoic acid (MQ, 83) (0.2)	hydroxybutanedioic acid (MQ, 91) (0.5)	3-hydroxybutanoic acid (MQ, 82) (0.3)
				
methylbutanedioic acid (MQ, 85) (0.1)	2,3-dimethylbutanedioic acid (MQ, 88) (2.1)	trans-butenedioic acid (MQ, 95) (2.1)	trans-methylbutenedioic acid (MQ, 91) (2.0)	
				
4-hydroxypentanedioic acid (MQ, 86) (3.3)	3-carboxypyridine (MQ, 86) (2.1)	2-hydroxybenzoic acid (1.7)	1,3-benzenedioic acid (0.3)	palmitic acid (0.8)
				
stearic acid (0.8)	pentanedioic acid (MQ, 87) (0.8)	butanedioic acid (MQ, 91) (0.8)		
Total identificado: 23.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra				

Table 13. Products characterized from the hydrolysis of the HPO-N fraction.
The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample)
in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS
(NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on
comparison with reported spectra.

 2-hydroxybutanoic acid (MQ, 81) (6.9)	 methylpropanoic acid (MQ, 88) (0.3)	 3-hydroxybutanoic acid (MQ, 83) (2.2)	 methylbutanedioic acid (MQ, 91) (7.7)
 butanedioic acid (MQ, 87) (20.7)	 2-hydroxypentanoic acid (MQ, 81) (1.7)	 trans-butenedioic acid (MQ, 99) (2.6)	 trans-methylbutenedioic acid (MQ, 85) (4.5)
 hydroxybutanedioic acid (MQ, 88) (19.3)	 pentanedioic acid (MQ, 86) (10.6)	 2-hydroxyhexanedioic acid (MQ, 89) (2.5)	
 glycine (9.2)	 sarcosine (6.3)	 isoleucine (5.7)	 proline (3.5)
 valine (31.1)	 pyrrol-2-carboxylic acid (3.5)	 2-carboxypyridine (MQ, 93) (7.4)	 3-carboxypyridine (MQ, 88) (3.8)
 4-carboxypyridine (MQ, 89) (0.5)	 benzoic acid (4.5)	 2-hydroxybenzoic acid (8.2)	
 phenol (0.3)	 (2-hydroxyphenyl)acetic acid (MQ, 81) (2.1)	 stearic acid (1.2)	 palmitic acid (20.8)
	 dodecanoic acid (MQ, 91) (0.4)		

Total identificado: 151.9 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra

Tabla 14. Products characterized from the hydrolysis of the HPI-A fraction. The number in brackets represents the estimated quantity ($\mu\text{g mg}^{-1}$ sample) in the mixture and MQ indicates the match of quality with the library MS (NIST98) in those cases in which the structure is proposed based on comparison with reported spectra.

$\text{HOOC}-\text{COOH}$ ácido etanodioico (0.2)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ácido butanodioico (CL, 97) (0.4)	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ácido propanodioico (CL, 91) (0.2)	$\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ácido trans-butanodioico (CL, 88) (4.1)
$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$ ácido hidroxi butanodioico (CL, 83) (12.4)	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ácido 2-hidroxi butanico (CL, 89) (17.5)	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ ácido pentanodioico (CL, 84) (12.4)	
Total identificado: $37.0 \mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra			

Mass spectrometry study of the fractions

In the previous sections we have submitted the fractions to some chemical treatment either silylation or harsh basic hydrolysis followed by silylation and then analyzed the mixture by GC-MS. This has allowed us identifying a significantly large number of individual compounds. However, as commented above in the case of the basic hydrolysis, the chemical treatment can alter the composition of the organic matter and, in addition, GC is biased towards volatile compounds. High molecular mass molecules must be minor components of the Turia river water according to the membrane mass cut-off, but it is evident that GC analyses (even after silylation) is more suited for low molecular mass components. For these reasons, it is of interest to cross check the organic matter composition by other independent techniques. In this context, we performed a comprehensive mass spectrometry study of the different fractions.

Initially we used MALDI-TOF-MS. This spectrometric technique has not limitation in the molecular weight of the analytes (Hillenkamp and Katalinic, 2007). The MALDI-TOF MS of the four fractions are given in Figures 5-7. The most notable feature of the MALDI-TOF-MS is the simplicity of the HPO-A and TPI-A spectra. Moreover, it is important to note the low molecular

weight of the components. Since MALDI-TOF-MS is a soft ionization technique that does not fragment the analytes, the MALDI-TOF spectra shown in Figures 5-7 indicate that, the molecular weight of most of the DOM is below 1,500 Da and only some weak peaks have masses greater than this value. Considering that the molecular weight from humic and fulvic acids are above 2,000 Da, the first conclusion using MALDI-TOF-MS is the confirmation of the absence of significant quantity of this type of natural compounds.

In addition, the way in which the MALDI peaks are grouped for the HPO-A and TPI-A fractions suggests that there are families of closely related structures around each of these peaks of maximum intensity. This pattern is especially evident in the case of TPI-A fraction where the family of five peaks at similar mass are separated by about 270 Da. Mainly three families of peaks in the region centred at 550, 824 and 1,092 Da were observed. The pattern observed with MALDI-TOF-MS suggests that the components of DOM are mainly families of oligomeric compounds with relatively low molecular masses differing in the number of monomer units. The abundance of the DOM grows towards low molecular mass, this being again in line with the previous comments that most of the DOM has surprisingly low molecular mass.

Importantly, the HPO-A fraction is similar to the TPI-A one exhibiting a prevalent peak at 825 Da accompanied by four other groups of less intense signals that are common in both fractions (compare Figures 5 and 6). Moreover, the GC-MS study of these two fractions after derivatization were also very similar. This suggests that the fractionation process used following the recommended standard protocol is not very efficient to discriminate the components of the DOM from the Turia river. Recently, the same conclusions about the inefficiency of the use of resins for fractioning has been reached using different hydrophilic and hydrophobic model compounds and observing that they are not fully retained in a single fraction (Bond et al., 2009).

Figure 5. MALDI-TOF-MS of HPO-A fraction

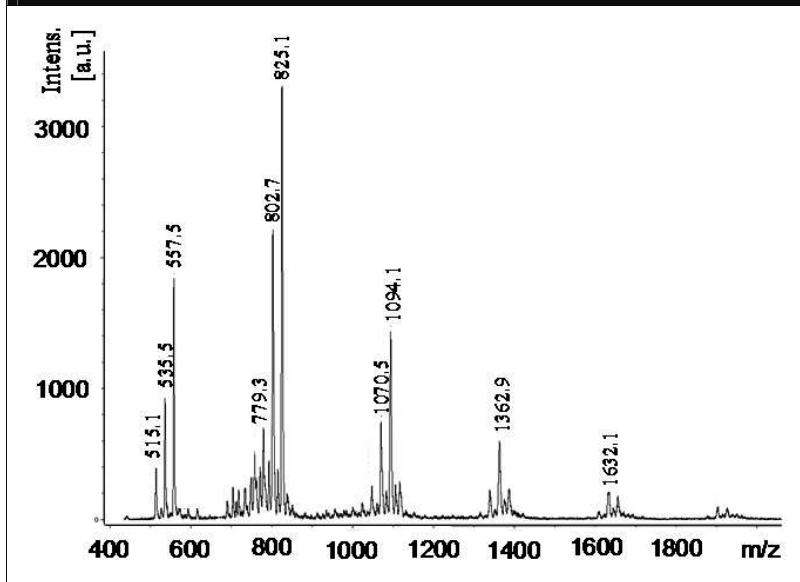
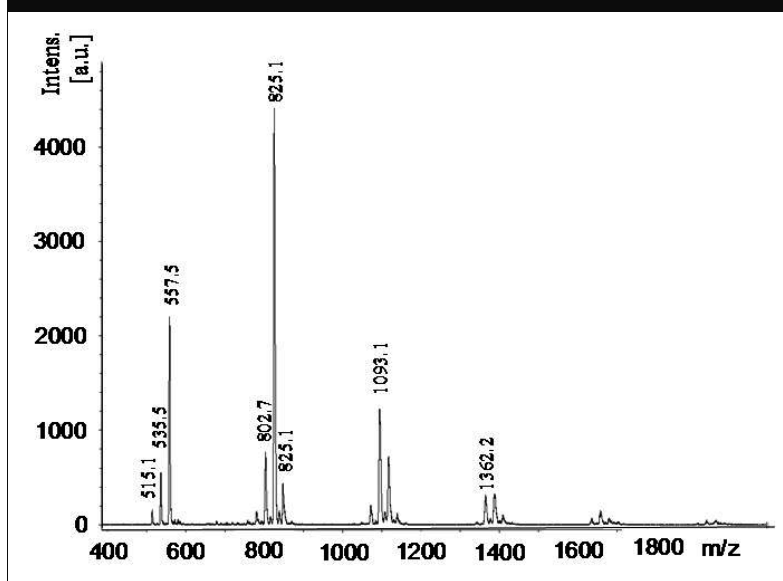


Figure 6. MALDI-TOF-MS of TPI-A fraction



In addition to these MALDI-TOF-MS spectra, Figures 7 and 8 show the data of two independent HPO-A and TPI-A fractions obtained from two different concentrates of the Turia river sampled with two weeks of difference. The procedure to obtain these two fractions includes

independent sampling followed by concentration using NF90 membrane and fractionation using DAX8/XAD4 resins. As commented earlier, HPO-A and TPI-A are the two most important fractions in terms of DOC (about 75 % of the total DOC). As can be seen from these figures the spectra of these two sets of fractioning are very similar but not exactly coincident indicating that besides the main constituents of Turia river other less abundant compounds undergo significant variations even in the short period of time under study (June-July 2006).

Figure 7. MALDI-TOF-MS spectra of HPO-A fractions from two different sampling data.

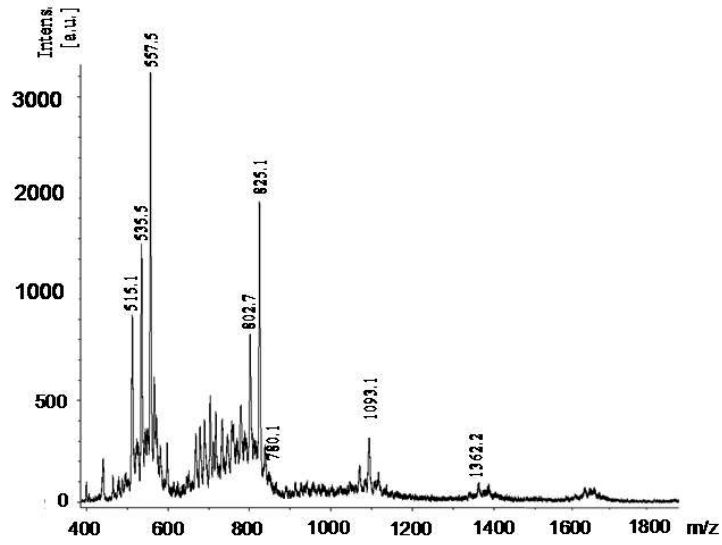
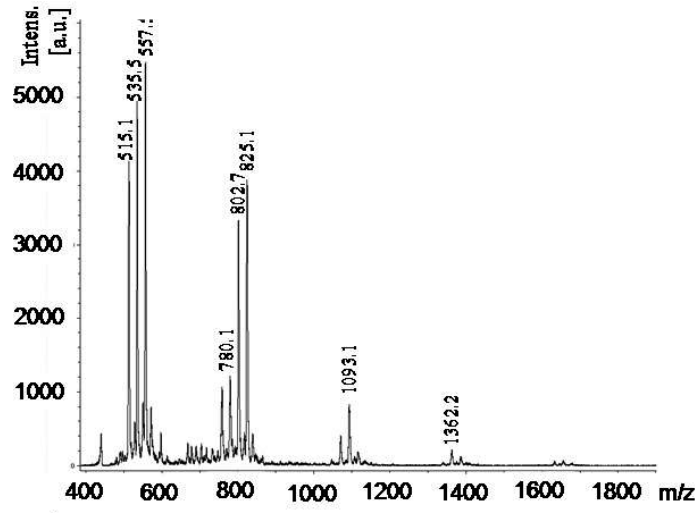
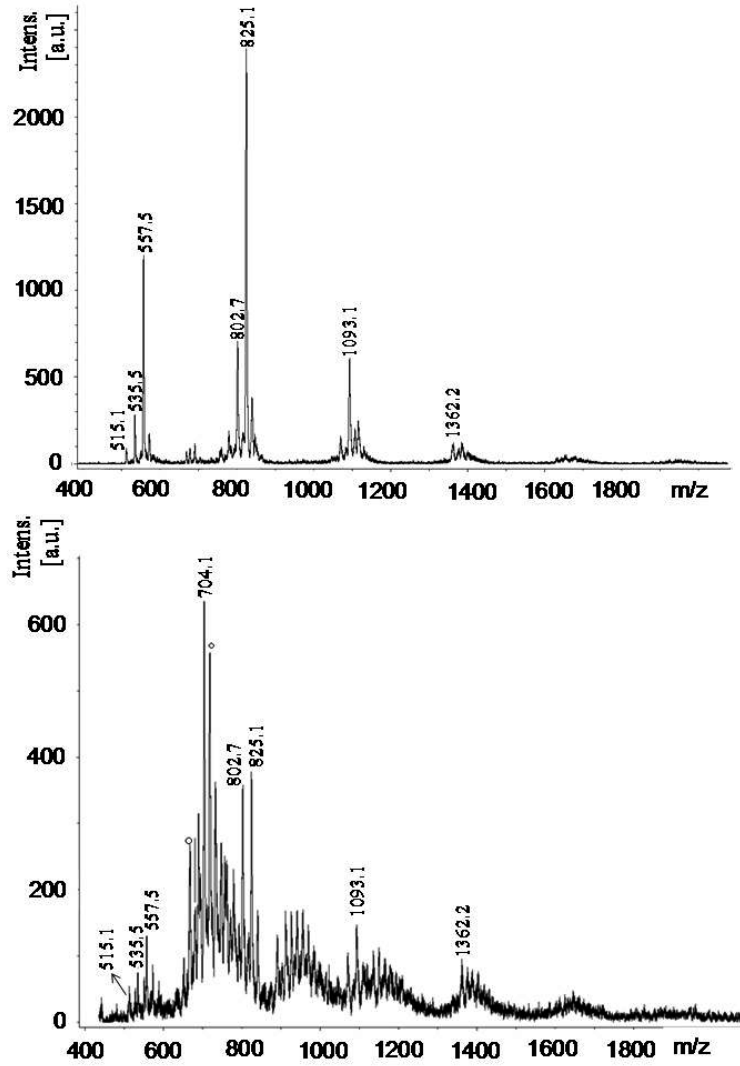


Figure 8. MALDI-TOF-MS spectra of TPI-A fractions from two different sampling data. Represent the dithranol matrix signals.



To complete the comparison of the composition Figure 9 shows the MALDI-TOF-MS spectra of HPO-N and HPI-A fractions. These spectra reconfirms that the samples are mainly composed of low molecular weight compounds and that the complexity of the fractions is relatively low with some variation depending on the sampling date.

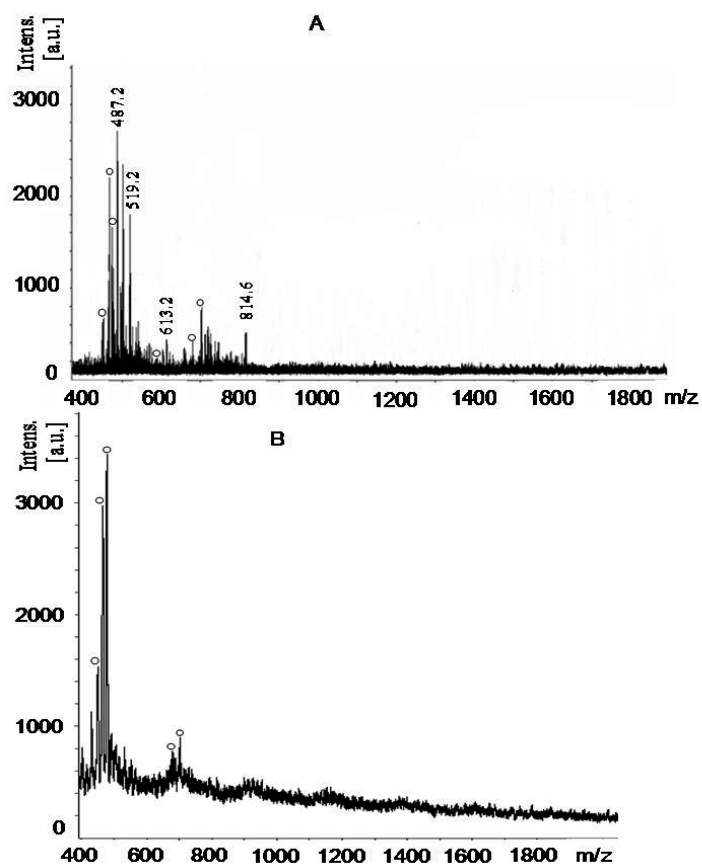


Figure 9. MALDI-TOF-MS of the HPO-N (A) and HPI-A (B) fractions.

Represent the dithranol matrix signals.

Analysis by ESI-API-MS and ESI-MS/MS

In order to gain information about the structure and composition of the most important peaks of the four fractions, we submitted them to ESI-API-MS. This technique has three main differences with MALDI-TOF MS, which is a soft ionization technique: 1) the possible incorporation in the molecular ions of the cation present in the electrolyte, 2) the possibility of some fragmentation in the ionization process, 3) the possibility of from doubly charged compounds. In addition, ESI-API-MS has a limitation in the mass range that should be below 1,700 Da. However, in view of all the previous comments on the molecular weights of the components present in the water of the Turia river it seems that this mass range between 150 and 1,700 Da is appropriate in our case.

Since we introduced directly the four fractions (HPO-A, TPI-A, HPO-N and HPI-A) in the system and the fractions that are not pure compounds, the occurrence of fragmentation by ESI-API-MS makes uncertain the assessment of the mixture complexity by this technique. We notice, however, that information about the number of components in the mixture has been obtained by MALDI-TOF-MS as indicated before. The main technical advantage of ESI-API-MS using a ion trap is that it allows to obtain the mass spectrum of selected peaks (ESI-MS/MS). ESI-MS/MS provides a unique information of crucial importance since the MS of the single ions can be obtained without prior purification.

Figures 10 and 11 shows selected ESI-API-MS for the HPO-A and TPI-A fraction to illustrate the main features arising from this technique. As it can be seen there, ESI-API-MS reveals a remarkable regularity in the mass difference between the peaks, corresponding to a difference of 81/82 Da. Considering the characteristics of ESI-API-MS and the accuracy of the measurements the discrepancy between 81 and 82 could arise from differences in the number of protons and from the error of the measurement. In our case, based on literature, we propose that the observed losses of 81/82 Da would correspond to the loss of dehydrated hexose units ($180-18=162$), from a glycoside, with double charged fragments ($M_1/2 - M_2/2=162/2=81$). Thus, it is remarkable that starting from peaks about 800 Da a series of peaks with 81-82 mass difference can be traced. This sequence can

be tracked to mass values as low as 81 Da (see Figure 11) which would correspond to a substructure bonded to a glycoside (aglycon) or to a doubly ionized monosaccharide unit (Huddleston et al., 1993).

Therefore, the mass differences of 81/82 Da between ESI-API-MS peaks would correspond to the loss of dehydrated hexose units from a doubly charged ion giving rise to another doubly charged ion. There are abundant precedents in the chemical literature (Bao-Shiang Lee 2005; Bryan D. Woosley 2006; Huddleston 1993) about polysaccharide fragmentation that exhibit the same pattern as those shown in Figures 10 and 11.

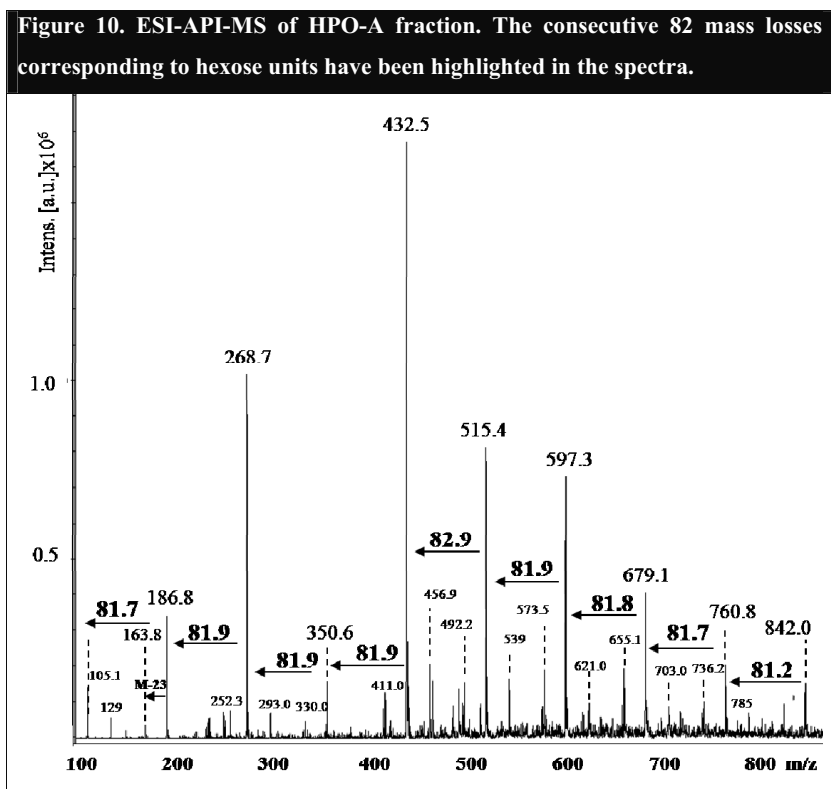
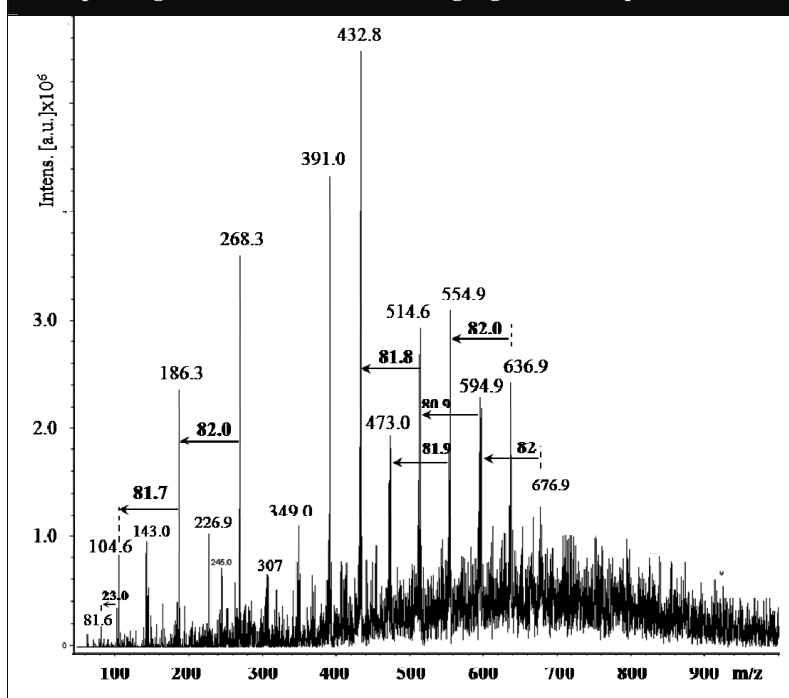


Figure 11. ESI-API-MS of TPI-A fraction. The consecutive 82 mass losses corresponding to hexose units have been highlighted in the spectra.



To further support the finding that HPO-A and TPI-A fractions are composed by oligosaccharides, we performed MS/MS of selected peaks appearing in the ESI-API-MS. Figure 12 shows, selected fragmentation patterns of three of the important peaks recorded in MALDI-TOF to illustrate the composition of these two fractions. Additional ESI-MS/MS spectra of the fractions HPO-A and TPI-A are shown in Figure 13. ESI-MS/MS spectra allow determining the number of dehydrated hexoses in the oligosaccharide by the number of 81/82 Da losses. The peak of lower mass would correspond to the aglycon unit to which hexose units were linked initially. Figure 12 shows a possible general structure deduced from the ESI-MS/MS spectra in which AG indicates the aglycon unit. In some cases, based on the literature (Bao-Shiang et al., 2005; Woosley et al., 2006; Zhang and Chelius, 2004), it has been possible to propose the identity of the the AG unit (i.e.

Figure 12d and 13b, N-acetylhexosamine+Na⁺), while in other cases the identity of the structural unit AG remains unknown.

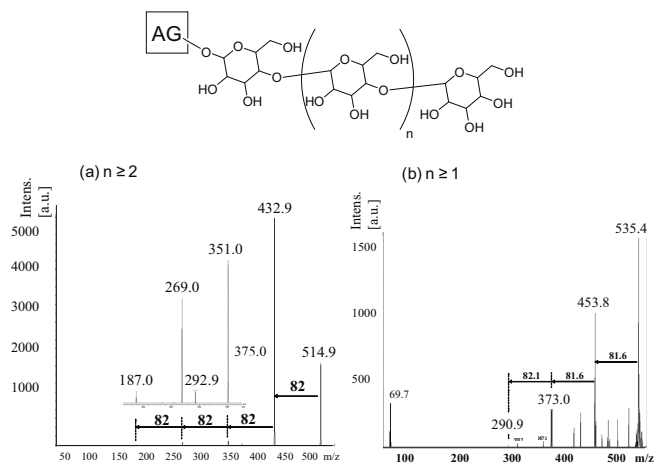


Figure 12. ESI-MS/MS spectra of some common and representative peaks of HPO-A and TPI-A fraction. Selected peaks: (a) 515 Da; (b) 554 Da.

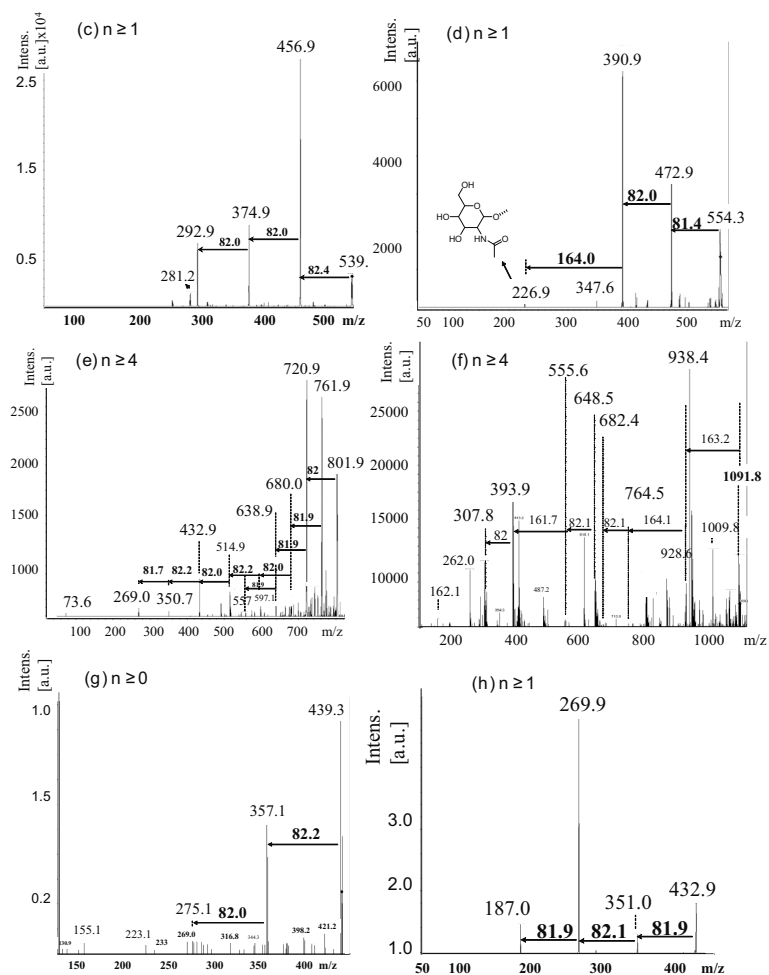


Figure 12. ESI-MS/MS spectra of some common and representative peaks of HPO-A and TPI-A fraction. Selected peaks: (c) 539 Da; (d) 554 Da; (e) 802 Da; (f) 1092 Da; (g) 439 Da; (h) 433 Da.

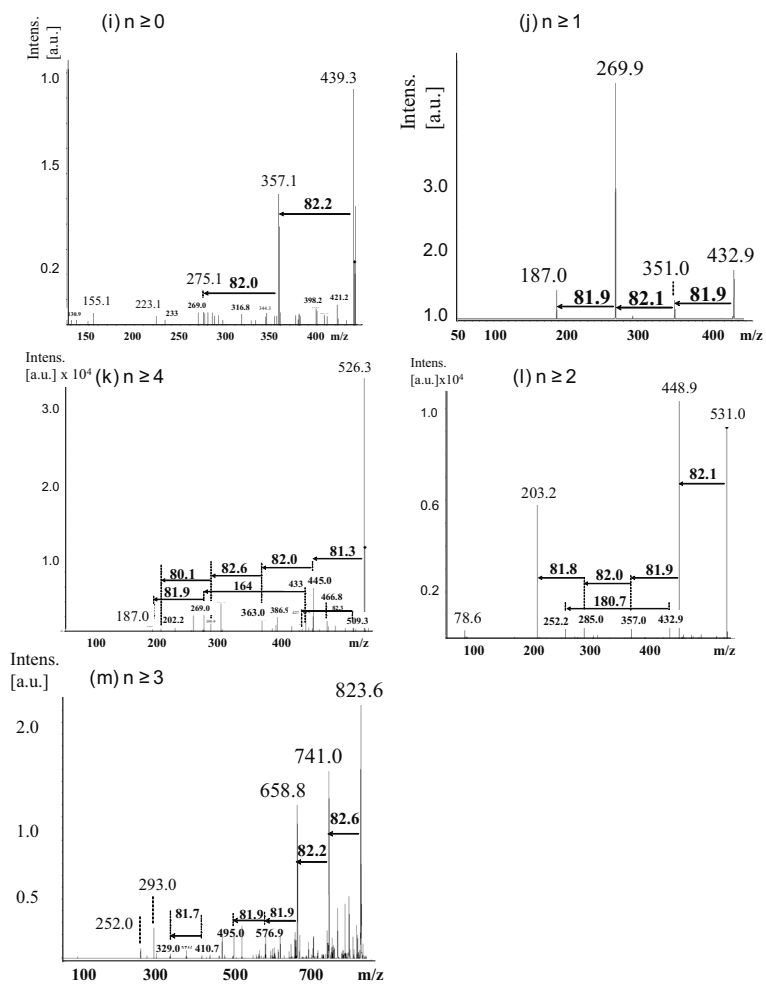
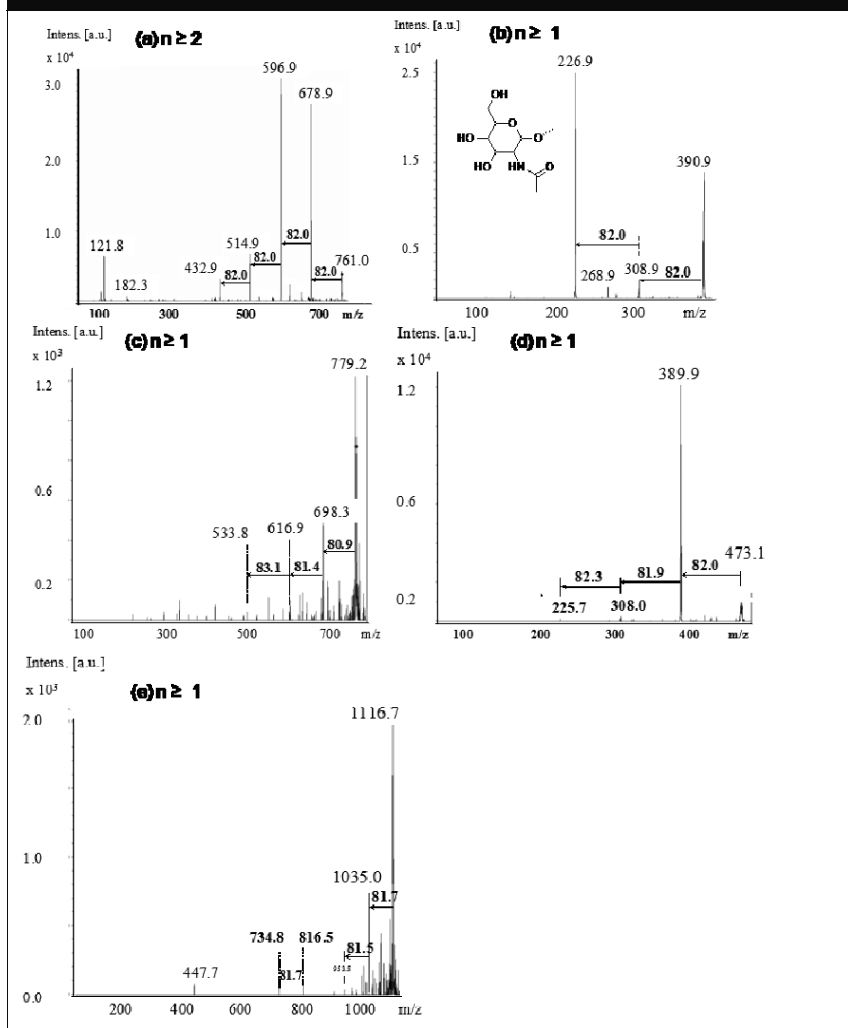
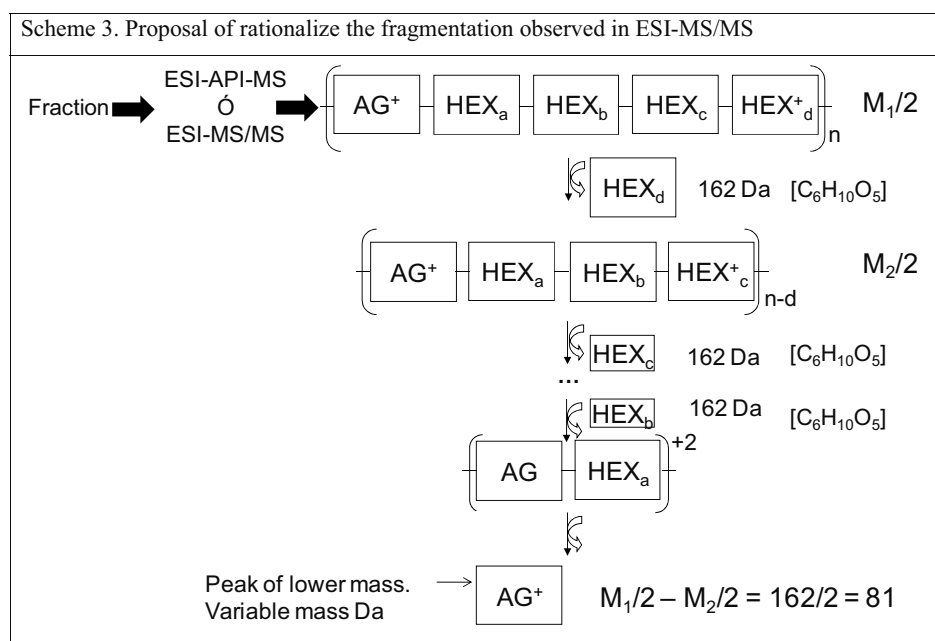


Figure 12. ESI-MS/MS spectra of some common and representative peaks of HPO-A and TPI-A fraction. Selected peaks: (i) 439 Da; (j) 433 Da; (k) 526 Da; (l) 531 Da; (m) 823 Da.

Figura 13. ESI-MS/MS spectra of some representative peaks of HPO-A fraction. Selected peaks: (a) 761 Da; and TPI-A: (b) 391, (c) 473, (d) 779 y (e) 1116 Da



Scheme 3 illustrates the proposal to rationalize the ESI-API-MS pattern. This proposal assumes that the ions bear a +2 charge (see Scheme 3) as it has been observed in numerous precedents (Bryan D. Woosley 2006; Cheliusb 2004; Huddleston 1993). So, the consecutive 81/82 losses would represent the gradual fragmentation of hexose units bonded to an aglycon forming part of an oligoglycoside. The total charge of the oligoglycoside is +2. Frequently, one of these two charges is present on the aglycon and the other one on the carbohydrate that undergoes fragmentation. Usually, the charge in the carbohydrate is generated in the ionization process while the aglycon charge is usually present before ESI-AP-MS measurement. It should be remembered that acid water is usually used in ESI-MS/MS to promote the presence of positive charge by protonation.



In short, the ESI-MS/MS study confirms that the main components of the DOM of the Turia river are oligosaccharides. Based on this, we propose that the observed regularity in Figures 5-8 (MALDI-TOF-MS) is due to the presence of families of compounds the same number of hexose units but differing in the aglycon unit.

In general, the information obtained from tandem ESI-MS/MS technique demonstrates the presence of hexoses as the main building block of the organic compounds of the HPO-A and TPI-A fractions. These data are consistent with the spectroscopic characterization of the fractions, especially with the $^1\text{H-NMR}$ spectra that shows bands between 3-5 ppm and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra with the presence of carbon about 70 ppm, characteristic of the saccharides. Also, the GC-MS analysis of silylated derivatives has shown a large number of monosaccharides (see Tables 6 and 7). The fact that oligosaccharides are not observed by GC-MS is not surprising considering its high molecular weight, low volatility, or the incomplete silylation. Thus, oligosaccharides cannot be properly analyzed by GC-MS. In addition, strong acidic conditions required for carrying out the silylation could cause partial hydrolysis of oligosaccharides to monosaccharides. To provide experimental data to support this hypothesis, we submitted to silylation a maltotriose sample (a trisaccharide with three glucose units and a molecular mass of 504 Da). Analysis by GC-MS of the mixture resulting upon silylation of pure maltotriose allowed to detect exclusively about 1% of isomeric monosaccharides, probably derived from acid hydrolysis under the derivatization conditions. It can be assumed that similar results would be obtained for other oligosaccharides. Thus, a percentage of the hexoses identified upon derivatization are likely to be present in the water forming part of oligosaccharides observed in MALDI-TOF-MS and ESI-MS/MS.

MALDI-TOF-MS and ESI-MS/MS techniques and the silylation studies also indicate that the Turia river water contain mainly oligosaccharides components of molecular weight below 1700 Da and a maximum number of hexose units of six (Figure 12k). This general feature of DOM from the Turia river explains the regularity observed in MALDI-TOF-MS where each group of peaks would correspond to oligosaccharides with the same number of sugar units and a different terminal glycon substructure. In this sense, we have shown that the GC-MS analysis of trimethylsilyl derivatives is biased toward the detection of smaller volatile components (hexose) which in part could be derived from oligosaccharides. Particularly noteworthy is the absence of humic and fulvic acids which are natural compounds whose presence is widely accepted as universal in the

composition of fresh waters. The presence of humic and fulvic is ruled out because such compounds would have been given peaks of high molecular weight (>2.000 Da). These high molecular mass peaks will not exhibit consecutive hexose fragmentations in the ESI-API-MS and ESI-MS/MS analysis.

In order to provide further support to our conclusions we submitted to ESI-MS/MS maltotriose and maltose (two oligosaccharides with three and two glucose units, respectively) as well as a commercial sample of humic acids from Aldrich. Figure 14 shows the obtained spectra of maltotriose and maltose. As it can be seen there, maltotriose and maltose fragmentation is characterized by the loss of 162 Da units that is also in agreement with the data reported in the literature (Cappiello et al., 2007). Figure 15 shows the ESI-MS/MS of some representative peaks from the ESI-API-MS of humic acids (Figure 15a). This Figure establishes the absence of a fragmentation pattern with consecutive 81/82 mass losses and show the complexity of humic acid mass spectra. In humic acids the high relative intensity of their molecular ion indicates the high stability of these molecules typical of aromatic structures. Thus, the completely different fragmentation pattern of oligosaccharides and commercial humic acids reinforce our conclusion about the nature of the DOM from the Turia river.

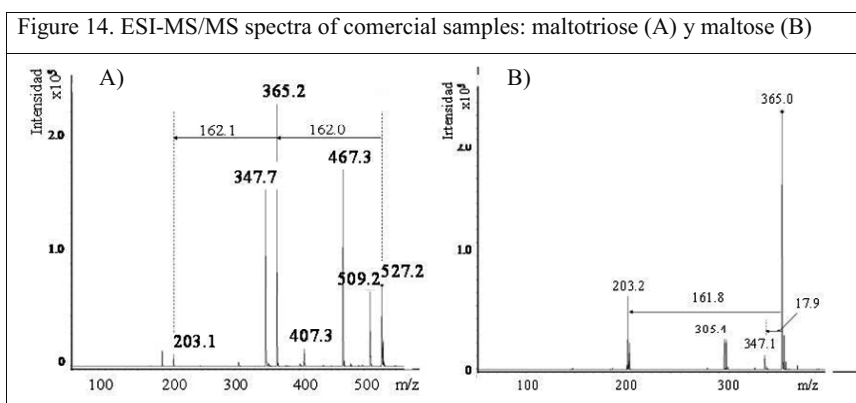
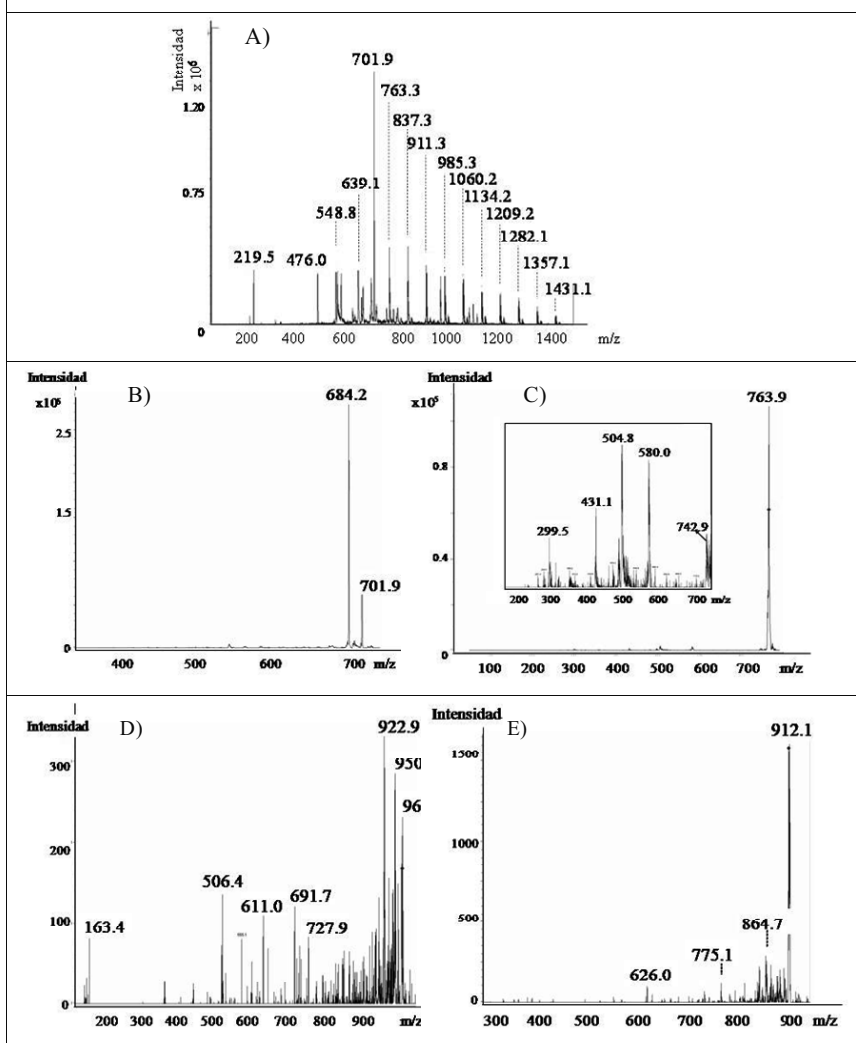


Figure 15. ESI-API-MS (A) and ESI-MS/MS (B,C,D,E) of some selected peaks from commercial humic acids (Aldrich).



After having commented the MALDI-TOF MS, ESI-API-MS and ESI-MS/MS of the HPO-A and TPI-A fractions, we undertook an analogous study with the HPO-N and HPI-A fractions. Figure 9, shows the corresponding MALDI-TOF MS of both fractions. In this case, however, it seems that these two fractions are more complex than the previous ones and no apparent clear patterning was observed. Specifically HPI-A fraction exhibits a considerably reluctance to undergo ionization and only peaks corresponding to the dithranol matrix were observed. This complexity is more clearly seen in the ESI-API-MS spectra of the samples (Figure 16). Figure 17 shows on the other hand two representative ESI-MS/MS spectra of HPO-N and HPI-A fractions. The complexity of them has not, however, precluded to propose any structure for them.

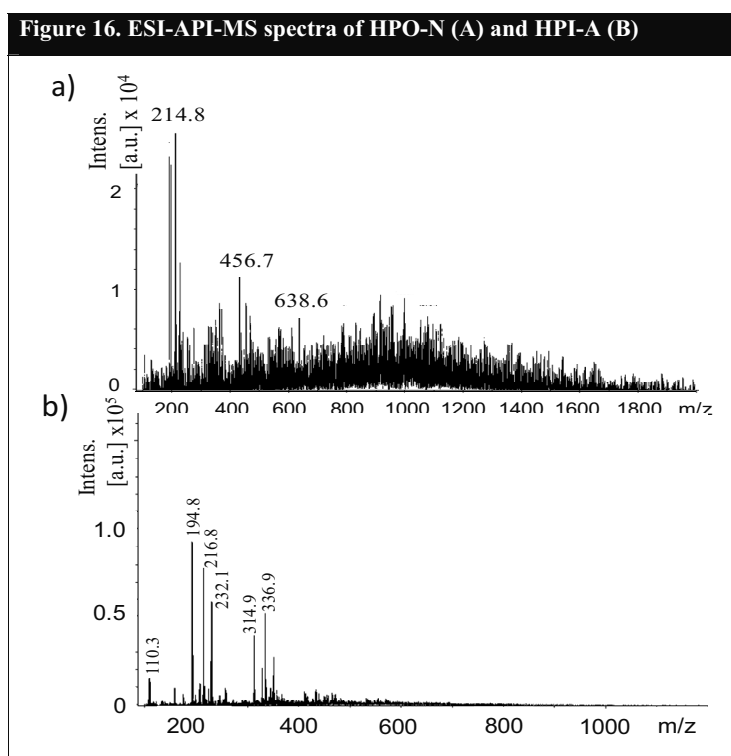
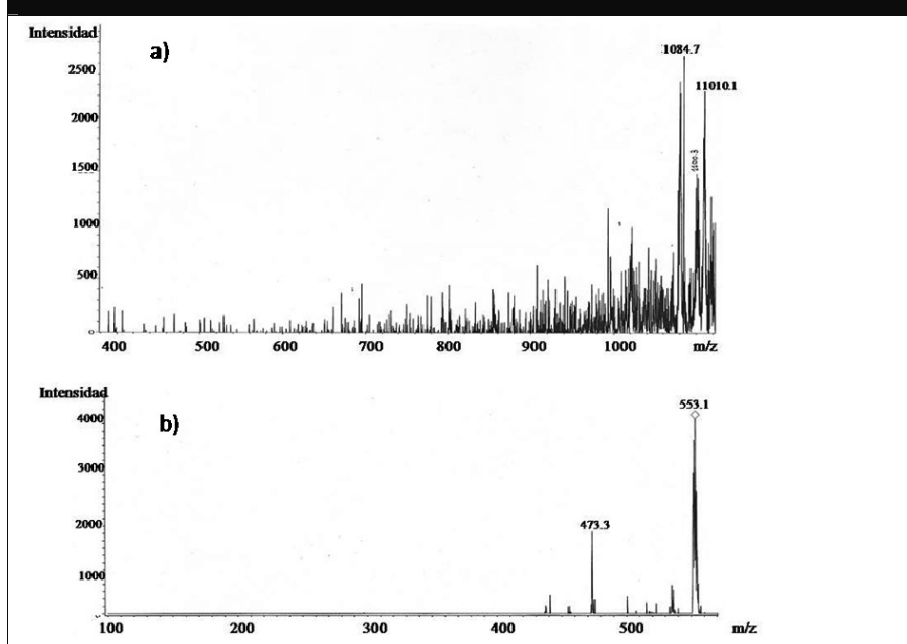
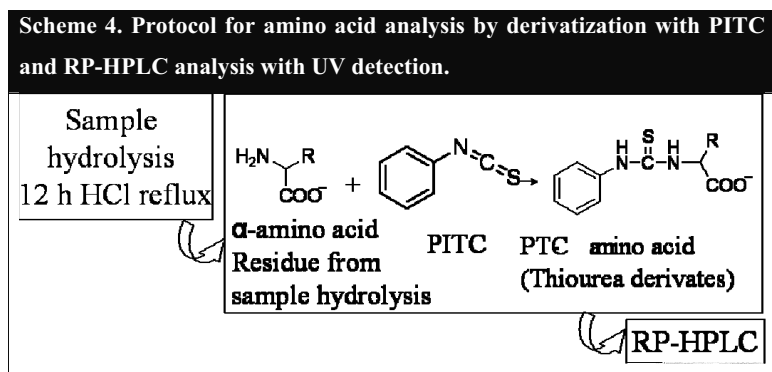


Figure 17. ESI-MS/MS of some representative peaks from HPO-N (a) and HPI-A (b) fractions



It is common for natural waters the presence of varying amounts of peptides and amino acids. In order to establish whether the Turia river water contains detectable oligopeptides we submitted the four fractions to acid hydrolysis and the resulting mixture after the hydrolysis was treated with phenylisothiocyanate (PITC). PITC reacts with the amino groups forming phenyl thioureas that can be analyzed by RP-HPLC and UV detection (see Scheme 4).



This is the standard procedure widely used in Biochemistry to determine the amino acid composition of peptides. The N-phenyl thioureas resulting from PITC derivatization were characterized and quantified by reverse phase (RP-HPLC) comparing the retention times with authentic samples. Following this protocol, we have been able to identify and quantify the amino acids shown in Table 15.

Table 15. Detected amino acids after acid hydrolysis of the HPO-A, TPI-A and HPO-N fractions ($\mu\text{g mg}^{-1}$ of sample)

	HPO-A	TPI-A	HPO-N	HPI-A
Aspartic acid	0.07		98.37	
Glutamic acid	0.48	0.2	4.10	0.21
Serine			1.08	
Glycine	0.35		6.03	0.18
Histidine	0.16			0.06
Arginine				
Threonine				
Alanine			3.35	0.24
Proline			58.47	
Valine	0.19	0.06		
Methionine				
Cysteine				
Isoleucine				
Leucine	0.06	0.03		
Phenylalanine			6.22	
Lysine				
Total ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de muestra)	1.31	0.29	177.62	0.69

As it can be seen in Table 15, HPO-N fraction with $177.62 \mu\text{g mg}^{-1}$ is the fraction with higher amino acid concentration. These data agree with previous spectroscopic characterization where there was a band at $1,628 \text{ cm}^{-1}$ in the FT-IR spectrum. Furthermore, $^1\text{H-NMR}$ of HPO-N fraction indicates the characteristic signals of amino acids: 1) between 3.9 and 3.3 ppm for H in α position, 2) between 3.3 and 2.0 ppm for H of the aliphatic chain. Moreover, in $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy the following signals were recorded: 1) between 50-30 ppm typical for C in α position, 2) 74 and 20 ppm of aliphatic C. Also after hydrolyzing the sample HPO-N in basic medium several silyl derivatives of amino acids were detected in GC-MS. Particularly relevant is the presence of aspartic acid which among all the amino acids is the main precursor of haloacetic acids (HAAs).

CONCLUSIONS

Our study provides data of the composition of the Turia river water. The analytical data indicates that dissolved organic matter from the Turia river is basically formed by family compounds with molecular weights below 2,000 Da. Specifically, we have identified polysaccharides, fatty acids, aliphatic polycarboxylic acids and amino acids. The absence of humic and fulvic acids generally considered to be present in all types of surface water has also demonstrated. Moreover, it has been detected paracetamol showing that the Turia river present anthropogenic pollution.

Knowledge of the chemical composition may serve to increase the understanding of the THM precursors and long term could be the basis for improving drinking water quality based on strategies specifically designed for a natural resource.

REFERENCES

- Aiken, G. R., Thurman, E. M., Malcolm, R. L., and Walton, H. F. (1979). "Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution." *Analytical Chemistry*, 51(11), 1799-803.
- Bao-Shiang Lee, S. K., Syed Salman Lateef, Nabila Salman Lateef and Shalini Gupta. (2005). "Oligosaccharide analyses of glycopeptides of horseradish peroxidase by thermal-assisted partial acid hydrolysis and mass spectrometry." *Carbohydrate Research*, 340, 1859-1865.
- Bellar, T. A., Lichtenberg, J. J., and Kroner, R. C. (1974). "Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters." *Journal - American Water Works Association*, 66(12), 703-6.
- Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R., Aiken, G. R., Kendall, C., and Silva, S. R. (2000). "Trihalomethanes formed from natural organic matter isolates: using isotopic and compositional data to help understand sources." *ACS Symposium Series*, 761(Natural Organic Matter and Disinfection By-Products), 206-222.
- Bolto, B., Dixon, D., Eldridge, R., King, S., and Linge, K. (2002). "Removal of natural organic matter by ion exchange." *Water Research*, 36(20), 5057-5065.
- Bond, T., Henriot O., Goslan E.H., Parsons S.A., Jefferson B., Disinfection byproduct formation and fractionation behavior of natural organic matter surrogates, Environ. Sci. Technol (DOI: 10.1021/es900686).
- Bryan D. Woosley, Y. H. K., V. S. Kumar Kolli, Lance Wells, Dan King, Ryan Poe, Ron Orlandoa, and Carl Bergmann. (2006). "Glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase A." *Carbohydrate Research*, 341, 2370-2378.
- Buffle, J., Deladoey, P., and Haerdi, W. (1978). "The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters." *Analytica Chimica Acta*, 101(2), 339-57.
- Buffle, J., Greter F.L., and W., H. (1977). "Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes." *Anal. Chem.*, 49, 216-222.
- Cappiello A., Truffelli A., Famigliani G., Pierini E., Capellacci S., Penna A., Ricci F., Ingarao C., Penna N., Study on the oligosaccharides composition of the watersoluble fraction of marinemucilage by electrospray tandem mass spectrometry, *Water Res.* 41 (2007) 2911 – 2920
- Chelius, S. Z. a. D. (2004). "Characterization of protein glycosylation using chip-based infusion nanoelectrospray linear ion trap tandem mass spectrometry." *Journal of Biomolecular Techniques*, 15(2).
- Christman, R. F. (1979). "Progress Reports, EPA Research Grant No. R804430."
- Croue, J. P., Martin, B., Simon, P., and Legube, B. (1993). "Hydrophobic and hydrophilic substances in reservoir waters - extraction, characterization, and determination." *Water Supply*, 11(1, IWSA European Specialized Conference on Recently Identified Pollutants in Water Resources: Drinking Water Treatment in the Nineties, 1992), 79-90.
- Dragunov, S. I. (1961). "Soil Organic Matter, M.M. Kononova, Ed. (New York: Pergamon Press) p.65."
- Dress, W. J., Newell, S. J., Nastase, A. J., and Ford, J. C. (1997). "Analysis of amino acids in nectar from pitchers of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae)." *American Journal of Botany*, 84(12), 1701-1706.
- EU. (1998). "Directive on the Quality of Water intended for Human Consumption. 98/83/CE."
- Gjessing, E. T. (1970). "Ultrafiltration of aquatic humus." *Environmental Science and Technology*, 4(5), 437-8.
- Gjessing, E. T., Alberts, J. J., Bruchet, A., Egeberg, P. K., Lydersen, E., McGown, L. B., Mobed, J. J., Munster, U., Pempkowiak, J., Perdue, M., Ratnawerra, H., Rybacki, D., Takacs, M., and Abbt-Braun, G. (1998). "Multi-method characterization of natural organic matter isolated from water: characterization of reverse osmosis-isolates from water of two semi-identical dystrophic lakes basins in Norway." *Water Research*, 32(10), 3108-3124.
- Hänninen, K., and Niemelä, K. (1992). "Alkaline degradation of peat humic acids. Part II. Identification of hydrophilic products." *Acta Scandinavica*, 46, 459-463.
- Hillenkamp F., Katalinic J.P. MALDI MS: A practical guide to instrumentation, methods and applications. Hardcover, 2007.
- Huizhong M.A., Herbert E.A. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Research* 35 (2001) 985-96
- Huddleston, M. J., M.F. Bean, and S.A. Carr. (1993). "Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests." *Analytical Chemistry*, 65, 877-884.
- Koelle, W. (1984). "Humic acid removal with macroreticular ion exchange resins at Hannover." *N. A. T. O., Comm. Challenges Mod. Soc., [Tech. Rep.] NATO/CCMS, Stadtwerke Hannover A.-G., Hannover, Fed. Rep. Ger.* FIELD URL.
- Leenheer, J. A. (1981). "Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters." *Environmental Science and Technology*, 15(5), 578-87.
- Leenheer, J. A., McKnight, D. M., Thurman, E. M., and P.MacCarthy. (1989). "Structural components and proposed structural models of fulvic acid from the Suwanee River. In R.C. Averett, J.A. Leenheer, D.M. McKnight, and K.A. Thorn, eds. Humic substances in the Suwanee river, Georgia: interactions, properties, and proposed structures. USBS Report 87-557, Denver, CO." 335-359.
- Leenheer, J. A., Wilson, M. A., and Malcom, R. L. (1987). "Presence and apotential significance of aromatic-ketone groups in aquatic humic substances." *Org. Geochemistry*, 11, 273-280.
- Legube, B., Croue, J. P., and Dore, M. (1985). "Chlorination of humic substances in aqueous solution: yields of volatile and major non-volatile organic halides." *Science of the Total Environment*, 47, 217-22.
- Oedegaard, H., and Koottatep, S. (1982). "Removal of humic substances from natural waters by reverse osmosis." *Water Research*, 16(5), 613-20.
- Olga Kammona, Elpiniki Dini, Costas Kiparissides, and Allabashi, R. (2008). "Synthesis of polymeric microparticles for water purification." *Microporous and mesoporous materials*, 110, 141-149.
- Owen D.M., Amy G.L., Chowdbury Z.K., Paode R., McCoy G., and K., V. (1995). "NOM characterisation and treatability." *J. Am. Water Works Assoc.*, 87(1), 46-63.
- Perdue, E. M., and Gjessing, E. T. (1990). "Introduction." *In Organic Acids in Aquatic Ecosystems, eds E. M. Perdue and E. T. Gjessing, pp. 1-3. Wiley, Chichester.*
- Reckhow, D. A., Singer, P. C., and Malcolm, R. L. (1990). "Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations." *Environmental Science and Technology*, 24(11), 1655-64.
- Rook, J. J. (1974). "Formation of haloforms during chlorination of natural waters." *Water Treatment and Examination*, 23, Pt. 2, 234-43.
- Rook, J. J. (1976). "Haloforms in drinking water." *J. Am. Water Works Assoc.*, 68, 168-172.
- Rook, J. J. (1977). "Chlorination of fulvic acids in natural waters." *Environmental Science and Technology*, 11(5), 478-482.
- Schnitzer, M., and Khan, S. U. (1972). "Humic substances in the environment (New York: Marcel Dekker) p. 147."
- Serkiz, S. M., and Perdue, E. M. (1990). "Isolation of dissolved organic matter from the Suwanee River using reverse osmosis." *Water Research*, 24(7), 911-16.
- Stevenson, F. J. (1982). "Humus chemistry genesis, composition, reactions. Wiley Interscience, New York."
- Thurman, E. M. (1985). "Organic geochemistry of natural waters. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Pub, Dordrecht."
- Thurman, E. M., and Malcolm, R. L. (1981). "Preparative isolation of aquatic humic substances." *Environmental Science and Technology*, 15(4), 463-6.
- USEPA. (1995). "SAB report: safe drinking water. Future trends and challenges. An environmental futures report." *Report*, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. FIELD URL.
- USEPA. (1998). "National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products, final rule; Washington, DC." 69390-69476.

Woosley BD, Kim YH, Kumar Kolli VS, Wells L, King D, Poe R, Orlando R, Bergmann: Glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase A. *Carbohydrate Research* 341 (2006) 2370-78.

Zhang S., Chelius D. Characterization of protein glycosylation using chip-based infusion nanoelectrospray linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques* 15 (2004).

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl^- and Br^- on trihalomethane formation potential

Sergio Navalon¹, Mercedes Alvaro¹, Hermenegildo Garcia*

Instituto de Tecnología Química, Department of Chemistry, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2008

Received in revised form

19 June 2008

Accepted 8 July 2008

Available online 17 July 2008

Keywords:

Trihalomethanes formation

potential

Carbohydrates in water

Water chlorination

Water treatment

Kinetics of chlorination

ABSTRACT

Upon chlorination carbohydrates can give trihalomethanes (THMs). In the present work, we have studied the influence of pH, chloride or bromide concentration on the formation of THMs from carbohydrates. We have observed that THMs are not formed at acidic pH, while basic pH values only increase slightly the THM content, although the consumption of chlorine increases up to 100% with respect to pH 8. The presence of chloride in ppm increases the THM formation from carbohydrates without influence of the chlorine consumption. In the same manner, the presence of bromide ions in ppb also increases remarkably the THMs formed upon chlorination of saccharides. Even more, we have observed that at bromide concentrations below 100 ppb, complete incorporation of bromide in THMs occurs. Overall, the results obtained show that saccharides widely present in natural waters can give rise to significant THM concentrations in the disinfection process by chlorine.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Studies conducted on mammals have revealed that trihalomethanes (THMs) cause adverse effects in liver and kidney, and affect negatively to the nervous and reproductive systems (Chu et al., 1980; Bielmeier et al., 2001; WHO, 1998). There are also evidences relating THMs and bladder cancer (Cantor et al., 1985). Due to these adverse effects in human health (Attias et al., 1995; Dunnick and Melnick, 1993; George et al., 2002; Komulainen, 2004; Luben et al., 2007; Richardson et al., 2007; USEPA, 2005), the THM content in drinking water is subjected to a maximum content in drinking water (EU, 1998; USEPA, 1998). Most of the studies

concerning the mechanism of THM formation derived from the seminal work of Rook and Boyce about THM formation in the chlorination of resorcinol and β -diketones (Boyce and Hornig, 1980; Boyce and Hornig, 1983; Rook, 1974; Rook, 1980). Humic acids are organic macromolecules of natural origin and variable structure in where several moieties containing resorcinol, carbohydrate and diketonic subunits can be recognized (see Chart 1). Thus, a humic acid can be considered as being constituted by the binding of simpler constituents including carbohydrates. Since these pioneering studies and considering that humic acids contain in their structure phenolic moieties, most of the studies on THM formation have focused on chlorination of phenolic

* Corresponding author. Tel.: +34 96 387 7807; fax: +34 96 387 7809.

E-mail addresses: sernaol@doctor.upv.es (S. Navalon), malvaro@qim.upv.es (M. Alvaro), hgarci@qim.upv.es (H. Garcia).

¹ Tel.: +34 96 387 7007; fax: +34 96 387 9349.

0043-1354/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2008.07.011

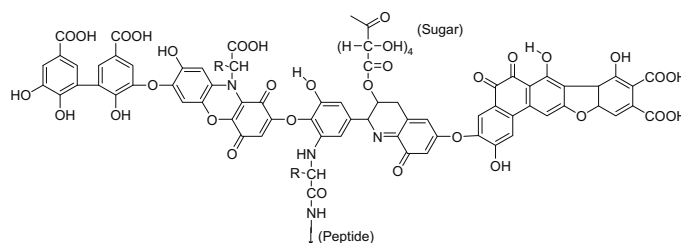


Chart 1 – Humic substances by Stevenson (1982).

compounds (Legube et al., 1985; Reckhow et al., 1990; Yang and Shang, 2004).

Besides humic acids, other biomolecules are also present in aquatic resources and can potentially form THMs. In this context, and in spite of their ubiquitous presence (Buffle, 1990; Chin-Chang Hung and Santschi, 2005; Mannino and Harvey, 2000; Meyers, 1995), there are not studies on carbohydrates as THM precursors upon chlorination. Carbohydrates are among the most abundant biopolymers in fresh and sea waters (Sigleo, 1996; Thurman, 1985). It has been shown that acid polysaccharides such as uronic acids can be excreted by algae and bacteria in response to low nutrient stress (Costerton, 1984). Hung et al. (2001) reported that the concentrations of dissolved acid polysaccharides can correspond up to 12% of the total carbohydrate fraction in the waters of the Gulf of Mexico. Sweet and Perdue (1982) have identified glucose, galactose, arabinose, xylose, mannose, fucose, and rhamnose as components of the organic matter in some North America rivers and lakes. Also we have found that the carbohydrates are important fraction (over 50 wt%) of the dissolved organic matter in river Turia in Spain (Navalon et al., submitted for publication-b).

As a follow up of our current research on carbohydrate as THM precursors (Navalon et al., submitted for publication-a), the present work describes that saccharides form THMs in variable amounts depending on the presence of promoters and the water treatment conditions. Specifically, herein we report the influence of pH and chloride and bromide concentration on the amount of THMs formed from a series of saccharides. Previous studies have shown that pH, chloride and bromide can affect THM formation (Clark and Lykins, 1994; Bellar et al., 1974; Nobukawa and Sanukida, 2001). This study is of relevance to understand THM formation from carbohydrates upon chlorine disinfection of natural waters in drinking water treatment plants. Of particular interest is when saccharides correspond a significant percentage of the total dissolved organic matter as it has been found to be the case in some natural resources (Navalon et al., submitted for publication-b).

2. Experimental

2.1. Materials

Mannose, maltopentaose, maltotriose, inositol, xylose, lyxose, ribose, fructose, maltose, glyceraldehyde, erythrulose, glucose,

galactose and maltose were supplied by Sigma–Aldrich. NaClO (10–13%), sodium thiosulfate, sodium chloride and sodium bromide were of analytical grade. Solutions were prepared using Milli-Q purified water. The pH values of the model aqueous solutions have been buffered at 5, 8 and 11 using H₃PO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, and K₃PO₄.

2.2. THMs analysis

Measurements were carried out averaging three independent experiments each of them giving consistent results within 15% variation. Chlorination and THM formation conditions were the following: 2 ppm dissolved organic carbon (DOC) of substrate, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C, 72 h when measuring the THM formation potential and at different times up to 400 h for kinetic experiments. The DOC of the model solutions was determined with the molecular formula of each substrate and the percentage of carbon in the structure. For instance to prepare a 2 ppm DOC solution of glucose requires 2 mg C/L/(12·number_of_carbon/molecular_weight). Thus, for glucose (C₆H₁₂O₆) %C = 6 × 12/180 = 0.4 for a solution of 2 ppm of DOC, the mass of glucose has to be: 2/0.4 = 5 ppm.

Solutions at 2 ppm DOC of phenol, resorcinol and carbohydrates were prepared from solutions at 10 ppm of substrate and diluted until the required concentration was achieved.

The concentrations of Br[−] (from NaBr) were 50, 100 and 300, 600 and 1000 ppb for THM formation potential and to 100–600 ppb for kinetic experiments (for initial reaction rate). The concentrations of Cl[−] (ReagentPlus NaCl, Aldrich) were 100 and 200 ppm. Note that the commercial NaCl used should contain a minute amount of NaBr that together with BrO[−] impurities in ClO[−] is responsible for the observation of 5–7% of CHBrCl₂ versus CHCl₃. Water samples were chlorinated to reach 10 ppm residual ClO[−], then the vials were sealed and stored in the dark at 20 °C for 72 h. This procedure follows the standard (APHA, 1998) method for THM formation potential.

The solutions were buffered at the required pH using phosphate buffers. Phosphate buffers were prepared at 0.1 M concentration and aliquots of these buffers were added to the reaction to obtain a concentration of 10 mM. In this way, pH 11 was set with K₂HPO₄ (0.1 M) and adjusting the pH with concentrated K₃PO₄. Likewise, pH 8 with K₂HPO₄ 10 mM and adjusting the pH with H₃PO₄, and pH 5 with

KH_2PO_4 and K_2PO_4 . After the required time, chlorination was stopped by reducing the residual chlorine in the 10 ml solutions with 0.1 g of thiosulfate, adding 0.1 g of NaCl to increase the ionic strength. Free chlorine was determined by the $\text{N,N}'$ -diethyl-1,4-phenylenediamine (DPD) method (ISO 7393-2:1985).

THM content was determined by analysis of the head gas of the vials with GC-ECD (Chromatograph Carlo-Erba 8139 with electron capture detector and Thermo Finnigan auto-sampler HS 2000) following the procedure of the UNE-EN ISO 10301 standard. Gas chromatographic analyses were performed using helium as carrier gas (85 kPa), and nitrogen as make up gas (110 kPa) in a DB.624 capillary column (30 m, crosslinked 5% phenyl methylsilicone), injecting 0.4 ml of the headspace. The injection and detector temperatures were 220 and 330 °C, respectively. The GC oven temperature was programmed. The initial temperature was 50 °C and was maintained for 1 min, then increased at a rate of 3 °C/min up to 180 °C and subsequently at a rate of 10 °C/min up to 210 °C.

3. Results and discussion

3.1. Influence of the pH on the THM formation

As previously observed, monosaccharides including aldoses and ketoses, from three to six carbons as well as di- and oligosaccharides at pH 8 give rise to THMs upon chlorination (Table 1) (Navalon et al., submitted for publication-a). In order to study the influence of pH on the THM formation potential (THMFP), chlorination was also carried out at acidic (pH 5) and more basic pH (pH 11). These pH values were chosen for the study because common hard waters have a pH value near 8 and the pH values 5 and 11 will show the influence of lower and higher pH values with respect to 8 as reference. The results are included in Table 1. As it can be seen there, chlorination at acidic pH clearly reduces the amount of THM formed. Previous studies in the literature have also found analogous influence of the pH on THMFP (Clark and Lykins, 1994; Wang and Huang, 2006), although using natural waters and no model saccharide solutions as we have found here. Concomitant titration of consumed chlorine indicates that the reduction of THMFP at acidic pH is a consequence of lower chlorine reactivity. In contrast, basic pH increases the chlorine consumption, particularly for monosaccharides. Specially, in the case of glyceraldehyde, chlorine consumption at pH 11 is almost double than the consumption at pH 8. Besides glyceraldehyde also for other monosaccharides, the influence of basic pH on chlorine consumption is significant. In general, pH 11 leads also to higher THMFP compared to pH 8. However, there is not a linear relationship between chlorine consumption increase and higher THMFP. This indicates that besides formation of THM, other pathways decomposing chlorine are also operating at pH 11. The most likely explanation is that concomitantly to the THM formation chlorine is also affecting the chemical oxidation of the saccharide. Overall, the results of Table 1 indicate that acid pH values strongly disfavours all the chlorine reactivity pathways including

THM formation. In contrast, reactivity of chlorine increases abruptly beyond pH 8.

Table 1 also includes a column (number 5) that shows which percentage of the initial carbons present in the saccharides ends up as THM. This column follows the same trend of THMFP, but reveals that only a small percentage of the initial carbon atoms (up to 0.78%) is converted into THM. This small percentage of carbon transformation occurs even though there is still free chlorine to react. This indicates that the kinetics of the reaction is slow and at the final time (72 h) according to standard procedure (APHA, 1998), the reaction has not taken place at completion. Actually at longer substrate chlorine contact times the amount of THM formed is higher indicating that the reaction progresses further (see below for time conversion plots, Fig. 1 and Fig. S1 in Supplementary material).

An interesting point is the fate of consumed chlorine. As column 6 in Table 1 reveals by comparing the molar ratio of consumed chlorine and THM formed, most of the chlorine reacted is not converted into THM. If all the consumed chlorine were converted into THM, the ideal consumed Cl_2 /THM molar ratio should be 3. A consumed Cl_2 /THM molar ratio larger than 3 indicates that some chlorine has reacted without giving rise concomitantly to the formation of THM. As it can be seen in column 6 of Table 1 the experimental consumed Cl_2 /THM molar ratio is significantly higher than 3 indicating that other processes besides THM formation are taking place predominantly. The deviation of consumed Cl_2 /THM formed molar ratio with respect to the value 3 allows determining which percentage of consumed chlorine ends up as THM. These values are also indicated in column 7 of Table 1. Considering the known reactivity of chlorine with respect to saccharides (Ivanov et al., 1962; Patel et al., 1973) the most reasonable processes that can consume chlorine are oxidation and formation of chlorinated products by C–H substitution.

With regard to the influence of the pH on the percentage of chlorine ending up as THM, the experimental data (see column 6, Table 1) indicates that pH 8 represents a relative maximum on the percentage of chlorine ending up as THM. Lower or higher pH leads to lower percentage of chlorine forming part of THM indicating that the competing reaction (oxidation and chlorination) is more favourable at extreme pH values.

In order to gain information about the fate of consumed chlorine that is not ending up in THM, we proceeded to determine by ion chromatography the difference of chloride, after complete reduction with AsO_2^- , between the initial time and at 72 h reaction time. NaAsO_2 is a convenient chlorine quencher (Hallinan, 1994) that, in contrast to thiosulfate does not interfere in ion chromatography with chloride determination. The data are given in columns 2 and 3 of Table 2. This difference represents the chlorine atoms that are bonded to carbon either as THM or as any other halogenated organic compounds. Scheme 1 presents chlorine atoms mass balance in saccharide chlorination. Comparison of the moles of chlorine bonded to carbon with that of chlorine forming part of THM (columns 4 and 5 of Table 2) indicates that, although minor amounts of halogenated organic compounds can be present in some cases (glyceraldehyde and fructose), most of chlorine bonded to carbon both at pH 8 and 11 corresponds


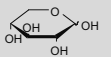
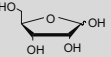
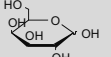
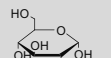
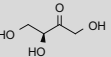
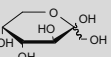
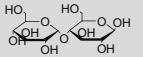
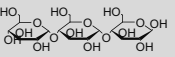
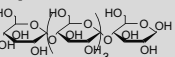


Table 1 - pH influence on THMFP of some carbohydrates upon chlorination							
Column	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d	6 ^e	7 ^f
	pH	THM (ppb)	THM (μmol)	Cl ₂ consumption (μmol)	THMs/total_initial_carbon molar ratio (%)	Consumed Cl ₂ /THMs formed molar ratio (%)	Chlorine consumed in THM (%)
Monosaccharides							
Aldoses							
Glyceraldehyde	11	81.7	0.68	85.7	0.39	125.4	2.4
	8	106.3	0.89	42.9	0.51	48.2	6.0
	5	19.2	0.16	14.0	0.06	84.8	3.5
Xylose	11	110.3	0.92	32.9	0.55	35.6	8.4
	8	91.7	0.76	20.0	0.46	26.2	11.0
	5	14.9	0.12	7.0	0.07	56.2	5.3
Ribose	11	110.3	0.92	35.7	0.54	38.7	7.7
	8	101.3	0.85	23.6	0.49	27.8	11.0
	5	21.6	0.18	12.9	0.11	74.6	4.0
Galactose	11	116.1	0.97	37.1	0.56	38.2	7.8
	8	105.3	0.88	22.9	0.51	25.9	12.0
	5	1.2	0.01	12.7	0.01	1228.5	0.2
Glucose	11	125.5	1.05	40.0	0.63	38.1	7.9
	8	88.9	0.74	21.4	0.44	29.0	10.0
	5	16.1	0.14	7.0	0.08	52.8	5.7
Ketoses							
Erythrulose	11	91.1	0.76	64.3	0.39	84.3	3.5
	8	83.0	0.69	57.1	0.35	82.3	4.0
	5	37.5	0.31	15.7	0.16	50.6	5.9
Fructose	11	133.7	1.12	57.1	0.66	51.06	5.8
	8	86.3	0.74	31.4	0.44	42.3	7.0
	5	17.3	0.14	22.5	0.08	167.3	1.8
Disaccharide							
Maltose	11	136.9	1.15	35.7	0.62	31.2	9.6
	8	106.7	0.89	24.3	0.48	27.2	11.0
	5	30.1	0.25	19.8	0.14	80.5	3.7
Oligosaccharides							
Maltotriose	11	146.3	1.22	42.9	0.74	35.0	8.6
	8	130.8	1.09	27.9	0.66	24.7	12.0
	5	20.8	0.17	9.9	0.10	58.8	5.1
Maltopentaose	11	156.8	1.31	40.0	0.78	30.4	9.8
	8	125.3	1.05	28.6	0.63	27.3	11.0
	5	3.7	0.03	23.2	0.02	809.5	0.4

Table 1 (continued)							
Column	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d	6 ^e	7 ^f
	pH	THM (ppb)	THM (μmol)	Cl ₂ consumption (μmol)	THMs/total_initial_carbon molar ratio (%)	Consumed Cl ₂ /THMs formed molar ratio (%)	Chlorine consumed in THM (%)
Traditional model compounds of dissolved organic matter							
Resorcinol 	8	1,653	13.84	143.0	2.56	10.3	29.1
Phenol 	8	271.9	2.28	143.0	0.36	62.8	4.7
Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C, 72 h reaction time.							
a Data from GC according to UNE-EN ISO 10301 standard. The prevalent component of THM is CHCl ₃ , accompanied by 5–7% CHBrCl ₂ arising from bromine contamination of chlorine reagents.							
b Obtained from the data column 2.							
c Determined by DPD titration.							
d Data from column 3 divided by the concentration of moles of carbons.							
e Data obtained by dividing column 4 by column 3.							
f Obtained by applying data of column 3 divided by column 4, in percentage.							

to THM. In any case, the data of column 3 of Table 2 clearly indicate that the main fate of consumed chlorine is the formation of chloride ions and, therefore, corresponds to reaction of chlorine as oxidizing reagent. This oxidation process is more prevalent at basic pH. In this regard, perusal of Table 2 reveals that at acidic pH, the consumption of chlorine is so low that accurate measurements cannot be done due to the low amount of THM formed under these conditions. Therefore, we propose that at acidic pH the main fate of consumed chlorine is also oxidation of the organic substrates.

3.2. Influence of the presence of chloride on THMFP

The main objective of this work is to show that in the process of chlorination of natural waters, the presence of saccharides contributes to the formation of THM. In this

context and considering that natural water in addition saccharides can have other components that can act as promoters of chlorination, it is of interest to study the influence of chloride ions as promoters of the formation of THMs from saccharides. For this purpose, we studied the THMFP at 72 h contact time of a series of model solutions of saccharides containing two different chloride concentrations.

It has been reported that the presence of chloride promotes the formation of THM for phenolic compounds (Nobukawa and Sanukida, 2001). For this reason, it is of interest to determine if also for saccharides as substrates, the THMFP increases when chloride ions are present in the concentration range typically found in natural fresh waters. The results obtained for the THMFP from the series of saccharides under study are listed in Table 3. As it can be

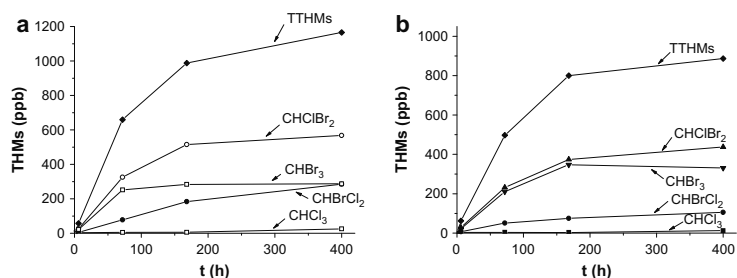


Fig. 1 – Temporal evolution of total (TTHM) and individual THMs for maltopentaose (a) and glyceraldehyde (b). Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C, [Br⁻]₀ = 1000 ppb.

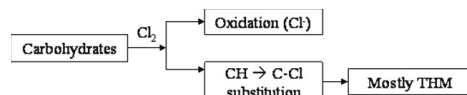
Table 2 – Consumed chlorine in the chlorination of saccharides

Column	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c	5 ^d
	pH	Total Cl ₂ atoms (μmol)	Cl ₂ ending in oxidation (μmol)	Cl ₂ ending bonded to carbon (μmol)	Cl ₂ ending in THMs (μmol)
<i>Monosaccharides</i>					
<i>Aldoses</i>					
Glyceraldehyde	11	85.7	81.91	3.80	2.05
	8	42.9	39.21	3.65	2.67
Xylose	11	32.9	30.08	2.78	2.77
	8	20.0	17.69	2.31	2.29
Ribose	11	35.7	32.89	2.83	2.77
	8	23.6	20.98	2.59	2.54
Galactose	11	37.1	34.15	2.99	2.91
	8	22.9	20.19	2.67	2.64
Glucose	11	40.0	36.79	3.21	3.15
	8	21.4	19.08	2.35	2.21
<i>Ketoses</i>					
Erythrulose	11	64.3	61.92	2.37	2.29
	8	57.1	55.04	2.10	2.08
Fructose	11	57.1	52.01	5.13	3.36
	8	31.4	29.17	2.26	2.22
<i>Disaccharides</i>					
Maltose	11	71.4	67.73	3.69	3.44
	8	48.6	45.87	2.70	2.68
<i>Oligosaccharides</i>					
Maltotriose	11	42.9	38.96	3.90	3.67
	8	27.9	23.89	3.97	3.07
Maltopentaose	11	40.0	35.94	4.06	3.94
	8	28.6	25.41	3.16	3.15
<i>Traditional model compounds of dissolved organic matter</i>					
Resorcinol	8	143.0	90.59	52.26	41.51
Phenol	8	143.0	118.49	24.37	6.83

Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, pH 8, 20 °C, 72 h reaction time.
a Estimated by ion chromatography. NaAsO₂ reduction at initial time.
b Estimated by NaAsO₂ reduction at final time (72 h).
c Difference between columns 2 and 3.
d From GC measurements of THM.

seen there, in all cases the THMFP at 72 h contact time increases along the concentration of chloride. In some cases such as glyceraldehyde and fructose, the THM increase is up to 80%.

With respect to the way in which chloride promotes THM formation it is noteworthy that this THM increase occurs



Scheme 1 – Reaction pathways for chlorine either as oxidation agent (giving chloride ions) or as C-H halogenating agent (giving chlorine atom disappearance from the solution).

without increasing the chlorine consumption. Actually, as column 4 in Table 3 shows the chlorine consumption is almost independent on the presence of chloride. The fact of chloride promotes THM formation without increasing chlorine consumption is reflected in columns 5 and 6 (Table 3), where the THM/total_initial_carbon molar ratio and consumed_Cl₂/THM formed molar ratio are given. Thus, upon increasing the chloride concentration the percentage of THM versus the total initial carbon increases. It has to be, however, noted that even on the presence of chloride ions less than 1% of the initial carbon ends up as THMs at 72 h even though there is still free chlorine to react. This reflects that the reaction is slow and that probably higher THM content will be formed at longer contact times (see below for the reaction kinetics, Fig. 1 and Fig. S1 in Supplementary material). Also column 6 in Table 3 shows that even though

Table 3 – Chloride influence on THMFP upon chlorination of some carbohydrates

Column	1 ^a	2 ^b	3	4	5	6	7
	[Cl ⁻] ppm	THM (ppb)	THM (μmol)	Cl ₂ consumed (μmol)	THM/ total_initial_carbon molar ratio (%)	Consumed Cl ₂ / THMs formed molar ratio (%)	Cl ₂ consumed in THM (%)
Monosaccharides							
Aldoses							
Glyceraldehyde	0	106.3	0.89	42.9	0.51	48.2	6.0
	100	153.8	1.28	42.9	0.73	33.5	8.96
	200	168.6	1.41	42.9	0.81	30.4	9.87
Ribose	0	101.3	0.85	23.6	0.49	27.8	11.0
	100	120.8	1.01	23.6	0.59	27.47	10.9
	200	134.2	1.12	23.6	0.66	23.32	12.9
Galactose	0	105.3	0.88	22.9	0.51	25.95	12.0
	100	123.1	1.03	22.9	0.60	22.09	13.6
	200	123.3	1.04	22.9	0.60	22.04	13.6
Glucose	0	88.9	0.74	21.4	0.44	29.0	10.0
	100	129.9	1.09	21.4	0.65	19.7	15.2
	200	123.4	1.03	21.4	0.62	20.7	14.4
Ketoses							
Erythrulose	0	83.0	0.69	57.1	0.35	82.3	4.0
	100	131.1	1.05	57.1	0.54	54.2	5.5
	200	146.2	1.22	57.1	0.62	46.7	6.4
Fructose	0	86.3	0.74	31.4	0.44	42.3	7.0
	100	147.9	1.24	31.4	0.73	25.4	11.8
	200	155.3	1.30	31.4	0.77	24.2	12.4
Disaccharide							
Maltose	0	106.7	0.89	24.3	0.48	27.2	11.0
	100	125.5	1.05	25.0	0.57	23.8	12.6
	200	138.0	1.16	25.0	0.62	21.6	13.8
Oligosaccharides							
Maltotriose	0	130.8	1.09	27.9	0.66	24.7	12.0
	100	143.1	1.20	27.9	0.73	23.1	13.0
	200	149.3	1.25	27.9	0.76	22.3	13.4
Maltopentaose	0	125.3	1.05	28.6	0.63	27.3	11.0
	100	143.2	1.20	28.6	0.72	23.8	12.6
	200	153.5	1.28	28.6	0.77	22.2	13.5

Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C, 72 h reaction time.
^a Initial concentration added to the model solutions
^b The predominant THM is CHCl₃ accompanied by 5–7% of CHBrCl₂ arising from the bromine present in the NaCl and NaOCl reagents.

the percentage of chlorine ending up as THM increases along the concentration of chloride, the prevailing fate of consumed chlorine is not the formation of THM. Ideally, if all the consumed chlorine was forming THM the consumed chlorine/THM formed molar ratio should be 3. The higher this ratio, the higher is the percentage of consumed chlorine not forming part of THM. Finally, column 7 in Table 3 gives the percentage of chlorine atoms forming THMs. As it can be seen in the Table 3, this percentage increases in the presence of chloride ions but is still far from the total incorporation of consumed chlorine into THM. On the other hand, using ion chromatography the disappearance of chloride based on the difference of the chloride concentration at initial and after 72 h of contact time was in agreement with the concentration of THM formed (see Table S1, in

Supplementary material). This fact indicates that the presence of other organohalogenated products besides THMs in the chlorination of saccharides is negligible.

3.3. Influence of the presence of bromide on the THMFP

In addition to chloride, the presence of bromide even in very low concentrations is also known to promote the THM formation (Bellar et al., 1974; Cooper et al., 1985; Krasner et al., 1994). Bromide is an anion typically present in natural aquatic resources, albeit in much lower concentration than chloride. In order to study the influence of bromide on THMFP from saccharide solutions, chlorination was carried out in the presence of five bromide concentrations in the range of ppb. These values are common in natural waters. The results obtained for

Table 4 – Bromide influence on FPTHM of some carbohydrates upon chlorination

Column	1 ^a	2	3	4	5	6	7
	[Br ⁻] (ppb)	THM (ppb)	THM (μmol)	Cl ₂ consumed (μmol)	THMs/total_ initial_carbon molar ratio (%)	Consumed Cl ₂ / THM formed molar ratio	Chlorine in THM (%)
<i>Monosaccharides</i>							
<i>Aldoses</i>							
Glyceraldehyde	0	106.3	0.89	42.9	0.51	48.2	6.0
	50	156.5	1.08	45.7	0.62	42.4	5.6
	100	222.3	1.44	50.0	0.82	34.8	6.2
	300	365.5	2.00	50.0	1.14	25.0	6.2
Mannose	0	108.2	0.91	21.0	0.54	23.2	12.9
	50	136.1	1.06	21.0	0.63	19.9	14.0
	100	165.6	1.25	21.0	0.74	16.7	16.1
	300	170.3	0.97	21.0	0.57	21.6	7.8
Inositol	0	101.5	0.85	18.6	0.51	21.8	13.7
	50	159.5	1.22	18.6	0.70	15.3	17.9
	100	181.7	1.37	18.6	0.82	13.6	19.8
	300	196.9	1.16	20.0	0.69	17.3	10.5
Xylose	0	91.7	0.76	20.0	0.46	26.2	11.0
	50	93.2	0.61	20.0	0.37	32.7	6.8
	100	116.5	0.72	20.0	0.43	27.7	7.3
	300	171.8	0.93	20.0	0.55	21.5	6.9
Ribose	0	101.3	0.85	23.6	0.49	27.8	10.8
	50	126.2	0.84	23.6	0.49	28.2	8.0
	100	127.6	0.81	23.6	0.48	29.1	7.2
	300	146.6	0.86	23.6	0.50	27.5	6.6
Galactose	0	105.3	0.88	22.9	0.51	25.9	11.6
	50	134.3	0.91	22.9	0.53	25.2	9.2
	100	153.5	0.97	22.9	0.56	23.7	8.8
	300	189.4	1.08	22.9	0.63	21.2	8.0
Glucose	0	88.9	0.74	21.4	0.44	29.0	10.0
	50	91.0	0.61	21.4	0.36	35.1	6.5
	100	109.3	0.69	21.4	0.41	31.0	6.7
	300	177.8	1.03	21.4	0.61	20.9	8.4
<i>Ketoses</i>							
Erythrulose	0	83.0	0.69	57.1	0.35	82.3	3.7
	50	118.3	0.86	57.4	0.44	66.9	3.8
	100	128.1	0.90	57.5	0.45	64.3	3.8
	300	177.6	1.00	57.8	0.50	58.1	2.8
Fructose	0	86.3	0.74	31.4	0.44	42.3	7.0
	50	95.1	0.65	31.4	0.38	48.5	4.8
	100	103.2	0.66	31.4	0.39	47.7	4.5
	300	159.8	0.92	31.4	0.55	33.9	5.2
<i>Disaccharide</i>							
Maltose	0	106.7	0.89	24.3	0.48	27.2	11.0
	50	142.6	0.98	25.7	0.53	26.3	9.05
	100	167.4	1.06	25.7	0.57	24.4	8.5
	300	237.6	1.36	28.6	0.73	21.0	8.1
<i>Oligosaccharides</i>							
Maltotriose	0	130.8	1.09	27.9	0.66	24.7	11.0
	50	145.0	0.98	27.9	0.59	28.3	8.3
	100	169.4	1.06	27.9	0.64	26.2	7.8
	300	259.1	1.45	27.9	0.89	19.2	8.5
Maltopentaose	0	125.3	1.05	28.6	0.63	27.3	11.0
	50	159.3	1.14	28.6	0.68	25.03	10.1
	100	152.2	0.96	28.6	0.57	29.95	6.9
	300	175.6	1.01	32.9	0.61	32.60	5.3

Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C, pH 8 and 72 h reaction time.

^a Initial concentration added to the model solution.

72 h contact time at three Br^- concentrations are summarized in Table 4.

From Table 4 (columns 2 and 3), it can be seen that the presence of bromide ions in ppb largely increases the amount of THM formed. As anticipated based on previous studies (Rebhun et al., 1990; Symons et al., 1993), bromide is significantly more efficient to promote THM formation than chloride (compare Tables 3 and 4). Importantly as we have commented previously in the case of chloride, the increase in THMFP does not generally occur at the expense of higher chlorine consumption (Table 4, column 4). Further data about the influence of Br^- on the relative oxidation versus substitution ratio can be found in the Supplementary material (Table S2).

As commented previously in the case of chloride promoted THM formation, also for the case of bromide the percentage of total initial carbon that is transformed into THMs is low (see column 5 in Table 4), although in one case overcomes 1%. Likewise, even though the amount of THMs can be relatively very high, most of the consumed chlorine does not end up in THMs (columns 6 and 7, in Table 4).

One interesting point is the distribution of THMs in the bromide promoted experiments. In the previous cases commented above, and since chlorine was the only halogen present in the solutions, the predominant THM was CHCl_3 accompanied with a small percentage (5–7%) of CHBrCl_2 arising from bromine impurities of chlorine reagents. In general, when bromide was added to the water at the concentration studied the amount of CHBr_3 was zero except for the highest concentration of bromide. Frequently CHBrCl_2 was found to be the major component of the THM mixture (see Supplementary material Table S3). This THM distribution can be rationalized based on the relative Cl/Br atomic ratio and the fastest uptake of bromine with respect to chlorine (Morris, 1978; Symons et al., 1993).

Concerning the temporal evolution of THMs, time conversion plots analysing THMs at different contact times, show that all THMs are primary and stable products, all being observed at short reaction times in similar distribution. This indicates that there is no interconversion between THMs under the conditions studied and that they are formed independently with constant apparent reaction rates (Frimmel and Jahnle, 2003). Fig. 1 illustrates the temporal evolution of each THM for the case of maltopentaose and glyceraldehyde, while additional plots can be found in Supplementary material (see Figs. S1–S4).

Concerning the fate of bromine and related to the way in which THM formation is promoted by the presence of bromide, mass balance of the bromine content present forming part as THMs at very long contact times indicates that a large percentage of the initial bromide became attached to carbon as THM. Fig. 2 shows for each initial bromide concentration the fraction that corresponds to brominated THMs. As it can be seen there, in some cases, the incorporation of the initial bromide in the THMs is even complete.

Concerning the influence of the initial bromide concentration on the THMFP interesting information can be obtained by plotting the initial reaction rate (r_0) versus the initial bromide concentration. r_0 was estimated from the slope of the curve of the temporal evolution of the total THM (see

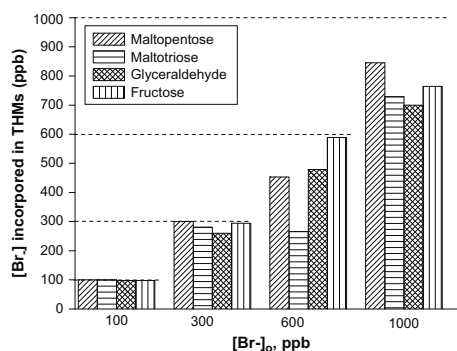


Fig. 2 – Bromide incorporation in THMs at final reaction time (400 h) for some saccharides as a function of $[\text{Br}^-]_0$. Reaction conditions: 2 ppm DOC, 10 ppm (143 μmol) free chlorine, 20 °C.

Fig. S1 in Supplementary material). Similar trends were observed for all the saccharides under study. Fig. 3 illustrates the influence of the initial bromide concentration on the THMFP r_0 . As it can be seen in this figure, r_0 increases with $[\text{Br}^-]_0$. The plots shown in Fig. 3 suggests a first order kinetics ($r_0 = k_{\text{app}}[\text{Br}^-]_0$) with respect to bromine, pointing out that Br^- accelerates the reaction by intervening in the rate determining steps of the mechanism.

In view of the available data, i.e. no influence of the consumed chlorine by $[\text{Br}^-]_0$, linear relationship between r_0 and $[\text{Br}^-]_0$ and that most of the initial bromide ends up as reaction products, we propose that bromides promotes THM formation without intervening in oxidation reactions

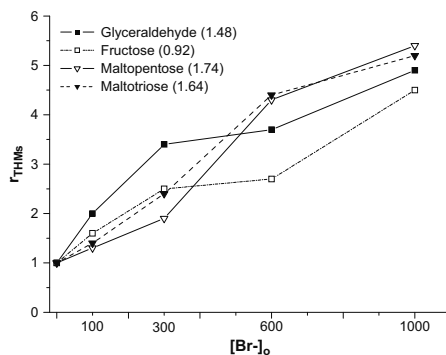
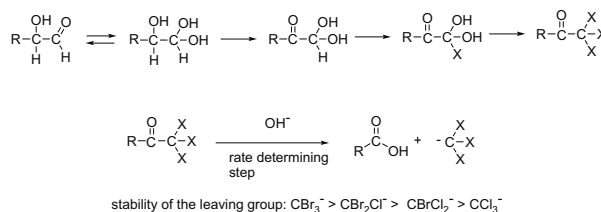


Fig. 3 – Influence of the initial bromide concentration on the initial THM rate. Data of the different saccharides have been normalized in the experiment with 0 ppb of bromide ions. The number in brackets indicates the initial reaction rate in the absence of bromide without normalization.



Scheme 2 – Simplified proposal to explain bromide promotion of THM formation by favouring C-C bond breaking from α -hydroxy aldehydes (the simplest saccharide structure).

probably by promoting the carbon-carbon bond cleavage leading to THM (March, 1993). In this step, a halogenated carbanion is formed (March, 1993). The fact that brominated methyl anions (CBr_3^-) are more stable than the chlorinated ones (CCl_3^-) is in agreement with our rationalization. Scheme 2 summarizes a mechanistic proposal based on the relative stability of halogenated carbanions.

4. Conclusions

The following conclusions can be drawn from the above presented results:

1. Saccharides do form significant concentrations of THMs (around 100 ppb) upon chlorination under conditions relevant in drinking water treatment (2 ppm DOC and 10 ppm Cl_2 , pH 8).
2. pH of the solution strongly influences the THMFP and chlorine consumption; at acidic pH values both THMFP and chlorine consumption are disfavoured; basic pH values increases chlorine consumption without affecting much THMFP that increases only slightly.
3. The presence of chloride in ppm concentration increases THM formation.
4. The presence of bromide in ppb concentration increases significantly THM concentration leading to a distribution of chlorine and bromine THMs.
5. Bromide is more efficient than chloride to promote the formation of THM.
6. Most of the initial bromide (up to 100%) ends up in THM.
7. The presence of bromide does not increase significantly chlorine consumption.
8. No interconversion between the individual THMs occurs under the reaction conditions, all the THMs appearing as primary and stable products.
9. The presence of bromide in low concentration increases the r_0 of THM formation following apparent first order kinetics.

Considering that saccharides as well as chloride and bromide anions are present in natural raw waters, the present study is relevant to understand the origin of THMs in the process of drinking water disinfection by chlorine. For instance, there are some natural fresh water resources that

contain about 1 ppm of saccharides (Navalnet et al., submitted for publication-b).

Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2008.07.011.

REFERENCES

- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, DC.
- Attias, L., Contu, A., Loizzo, A., Massiglia, M., Valente, P., Zapponi, G.A., 1995. Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans. *Science of the Total Environment* 171 (1-3), 61-68.
- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J., Kroner, R.C., 1974. Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *Journal - American Water Works Association* 66 (12), 703-706.
- Bielmeier, S.R., Best, D.S., Guidici, D.L., Narotsky, M.G., 2001. Pregnancy loss in the rat caused by bromodichloro methane. *Toxicological Sciences* 59, 309-315.
- Boyce, S.D., Hornig, J.F., 1980. Formation of chloroform from the chlorination of diketones and polyhydroxybenzenes in dilute aqueous solution. *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects* 3, 131-140.
- Boyce, S.D., Hornig, J.F., 1983. Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid. *Environmental Science & Technology* 17 (4), 202-211.
- Buffle, J., 1990. Complexation Reactions in Aquatic Systems - an Analytical Approach. Ellis Horwood Limited, England.
- Cantor, K.P., Hoover, R., Hartge, P., Mason, T.J., Silverman, D. T., Levin, L.I., 1985. Drinking water source and risk of bladder cancer: a case-control study. In: Jolley, R.L., Bull, R.J., Davis, W.P., Katz, S., Roberts, M.H., Jacobs, V.A. (Eds.), *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, vol. 5. Lewis Publishers, Chelsea, MI, p. 145.
- Chin-Chang Hung, K.W.W., Santschi, Peter H., 2005. A seasonal survey of carbohydrates and uronic acids in the Trinity River, Texas. *Organic Geochemistry* 36, 463-474.

- Chu, I., Secours, V., Marino, I., Villeneuve, D.C., 1980. The acute toxicity of four trihalomethanes in male and female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 52, 351.
- Clark, R.M., Lykins, B.W., 1994. DBP control in drinking water: cost and performance. *Journal of Environmental Engineering* 120 (4), 759-782.
- Cooper, W.J., Zika, R.G., Steinhauer, M.S., 1985. Bromide-oxidant interactions and THM formation: a literature review. *Journal - American Water Works Association* 77, 116-121.
- Costerton, J.W., 1984. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 115-123.
- Dunnick, J.K., Melnick, R.L., 1993. Assessment of the carcinogenic potential of chlorinated water: experimental studies of chlorine, chloramine, and trihalomethanes. *Journal of the National Cancer Institute* 85 (10), 817-822.
- EU, 1998. Directive on the Quality of Water intended for Human Consumption, 98/83/CE.
- Frimmel, F.H., Jahnke, J.B., 2003. Formation of haloforms in drinking water. In: Nikolaou, A. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry*.
- George, M.H., Olson, G.R., Doerfler, D., Moore, T., Kilburn, S., DeAngelo, A.B., 2002. Carcinogenicity of bromodichloromethane administered in drinking water to male F344/N rats and B6C3F1 mice. *International Journal of Toxicology* 21 (3), 219-230.
- Hallinan, F.J., 1994. Tests for active residual Cl and chloramine in water. *Journal - American Water Works Association* 36, 296-302.
- Hung, C.-C., Tang, D., Warnken, K., Santschi, P.H., 2001. Distributions of carbohydrates, including uronic acids, in estuarine waters of Galveston Bay. *Marine Chemistry* 73, 305-318.
- Ivanov, V.I., Derevenchuk, L.N., Chupeeva, V.V., 1962. The reaction of chlorine water with carbohydrates. *Russian Chemical Bulletin* 11 (1), 166-167.
- Komulainen, H., 2004. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. *Toxicology* 198 (1-3), 239-248.
- Krasner, S.W., Scilimenti, M.J., Means, E.G., 1994. Quality degradation: implications for DBP formation. *Journal - American Water Works Association* 86, 34-47.
- Legube, B., Croue, J.P., Dore, M., 1985. Chlorination of humic substances in aqueous solution: yields of volatile and major non-volatile organic halides. *Science of the Total Environment* 47, 217-222.
- Luben, T.J., Olshan, A.F., Herring, A.H., Jeffay, S., Strader, L., Buus, R.M., Chan, R.L., Savitz, D.A., Singer, P.C., Weinberg, H. S., Perreault, S.D., 2007. The healthy men study: an evaluation of exposure to disinfection by-products in tap water and sperm quality. *Environmental Health Perspectives* 115 (8), 1169-1176.
- Mannino, A., Harvey, H.R., 2000. Biochemical composition of particles and dissolved organic matter along an estuarine gradient: sources and implications for DOM reactivity. *Limnology and Oceanography* 45, 775-788.
- March, J., 1993. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structures*. McGraw Hill, New York.
- Meyers, P.A., 1995. Reaction mechanisms in environmental organic chemistry by R.A. Larson and E.J. Weber. *Organic Geochemistry* 23 (1), 95.
- Morris, J.C., 1978. The chemistry of aqueous chlorine in relation to water chlorination. In: Jolley, R.L. (Ed.), *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, vol. 3. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- Navalon, S., Alvaro, M., Garcia, H., Carbohydrates as unreported trihalomethane precursors upon chlorination. *Environmental Science and Technology*, submitted for publication-a.
- Navalon, S., Alvaro, M., Garcia, H., Characterization of dissolved organic matter from Turia river. Prevalence of low-molecular mass oligosaccharides. *Chemosphere*, submitted for publication-b.
- Nobukawa, T., Sanukida, S., 2001. Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water. *Water Research* 35 (18), 4293-4298.
- Patel, K.F., Mehta, H.U., Srivastava, H.C., 1973. Kinetics and mechanism of oxidation of carbohydrates with chlorine and its derivatives. *Starch* 25 (8), 266-271.
- Rebhun, M., Heller-Grossman, L., Manka, J., Kimel, D., Limoni, B., 1990. Trihalomethane formation and distribution in bromide-rich and ammonia-containing lake water. In: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, vol. 6. Lewis, Chelsea, MI, 665-680.
- Reckhow, D.A., Singer, P.C., Malcolm, R.L., 1990. Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations. *Environmental Science & Technology* 24 (11), 1655-1664.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R., DeMarini, D.M., 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* 636 (1-3), 178-242.
- Rook, J.J., 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment and Examination* 23 (Pt. 2), 234-243.
- Rook, J.J., 1980. Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of humic acids and resorcinol. *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects* 3, 85-98.
- Sigleo, A.C., 1996. Biochemical composition in suspended particles and colloids: carbohydrates in the Potomac and Patuxent Rivers. *Organic Geochemistry* 24, 83-93.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus Chemistry Genesis, Composition, Reactions*. Wiley Interscience, New York.
- Sweet, M.S., Perdue, E.M., 1982. Concentration and speciation of dissolved sugars in river water. *Environmental Science & Technology* 16, 692-698.
- Symons, J.M., Kransner, S.W., Simms, L.A., Scilimenti, M., 1993. Measurement of THM and precursor concentrations revisited: the effect of bromide ion. *Journal - American Water Works Association* 85, 51-62.
- Thurman, E.M., 1985. In: Nijhof, M., Junk, D.W. (Eds.), *Organic Geochemistry of Natural Waters*.
- USEPA, 1998. National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection by-products, final rule; Washington, DC, pp. 69390-69476.
- USEPA, 2005. Guidelines for carcinogen risk assessment, EPA/630/P-03/001.
- Wang, G.S., Huang, P.L., 2006. The roles of bromide and precursor structures on DBP formation and species distribution. *Water Science and Technology: Water Supply* 6 (4), 27-33.
- WHO, 1998. Chloroform (Addendum to vol. 2. Health criteria and other supporting information). In: *Guidelines for Drinking-Water Quality*, second ed. World Health Organization, Geneva.
- Yang, X., Shang, C., 2004. Chlorination byproduct formation in the presence of humic acid, model nitrogenous organic compounds, ammonia, and bromide. *Environmental Science & Technology* 38 (19), 4995-5001.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Ca²⁺ and Mg²⁺ present in hard waters enhance trihalomethane formation

Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia*

Instituto Universitario de Tecnología Química CSIC-UPV and Department of Chemistry, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 December 2008

Received in revised form 7 April 2009

Accepted 8 April 2009

Available online 16 April 2009

Keywords:

Trihalomethanes

Water chlorination

Water disinfection byproducts

ABSTRACT

Mg²⁺ and Ca²⁺ at concentrations typically found in hard waters (30–100 mg L⁻¹) promote THM formation in the disinfection process by hypochlorite. This THM enhancement occurs for model solutions as well as for natural water (Turia river). The use of model solutions has allowed establishing that THM promotion is a rather general effect for polyols, citric and humic acids, while for some other substrates such as histidine and dicarboxylic acids the influence of the presence of Mg²⁺ and Ca²⁺ is negligible. The results with Mg²⁺ and Ca²⁺ have been compared with that achieved with Cu²⁺. It has been observed that the effect of THM enhancement follows the order Cu²⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trihalomethanes (THMs) are undesirable byproducts in the water disinfection process by chlorine [1–5]. The concentration of THMs in drinking water is limited to a maximum legal value of 80 and 100 µg L⁻¹ in USA and Europe, respectively [6,7]. Changes in the variables that can make freshwater to overcome these values are significant with respect to this water quality parameter. Although the exact mechanism of THM formation from dissolved organic matter (DOM) is unknown, the fact that some inorganic ions can act as promoters enhancing the THM formation is well established [2,8–10]. Thus, bromide in µg L⁻¹ and chlorides in mg L⁻¹ concentration [11–13] increase the THM concentration with respect to solutions in which these anions are absent, acting as promoters in the sense that THM formation is enhanced with respect to analogous conditions in the absence of these anions. In this context, it has been reported that Cu²⁺ (1 mg L⁻¹) can catalyze THM formation from humic and citric acids [14,15]. However, due to the toxicity of copper ion [16] the presence of this transition metal ion in drinking water at the concentrations in which it catalyzes THM formation is unlikely [14]. Continuing with these precedents on the influence of inorganic ions on THM formation, it will be of more relevance for water treatment to determine if ubiquitous metal ions at the concentrations that can be typically encountered in natural waters are also promoters of THM formation. Furthermore, it is also of interest to delineate which types of organic compounds are more susceptible to enhance the THM formation when these metal ions are present. Hard waters are characterized by high con-

centration of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. Previous research has almost ignored the possibility that these alkali earth metal ions could influence THM formation. Starting from this point, we wanted to determine if the same effect is also observed for other types of compounds and other cations abundant in natural water. In particular, we wanted to establish the structural prerequisites for enhancement of the THM formation and to advance in the understanding of the mechanism through which the solvated cations catalyze THM formation. In this work we reported that Ca²⁺ and Mg²⁺ present in hard waters increase THM formation. In this regard, and particularly for citric acid, it is well known that metal ions can strongly bind to carboxylate groups [17]. Also carboxylate groups of aliphatic carboxylic acids can bind to alkali earth metal ions [18], the metal cation carboxylate complex being in equilibrium in aqueous phase with the solvated metal ion. Excess of metal ion with respect to the organic substrate favours the equilibrium towards formation of the metal carboxylate complex. Herein we speculate that the binding of the cation with carboxylic group could be the key feature in the promotion of THM formation. To prove this, we have performed a study of the influence of the presence of alkali earth metal ions on the amount of THM formed in model solutions containing different types of organic compounds that can be present in natural water. For the model solutions under study we have selected some representative compounds that can be reasonably found in freshwater. The total concentration was set at 2 mg L⁻¹ of dissolved organic carbon (DOC) in all the series of experiments. Some common DOC values in freshwaters are in the range 1–4 mg L⁻¹ [19,20]. We have compared their catalytic activity for THM formation with that of previously studied Cu²⁺ [14]. On the other hand, the range of concentrations used is relevant for water treatment [21] in which chlorination is effected in raw waters containing Mg²⁺ and Ca²⁺. In addition, although both the concentrations of the organic substrates

* Corresponding author. Tel.: +34 96 387 7807; fax: +34 96 387 7809.
E-mail address: hgarcia@qim.upv.es (H. Garcia).

(2 mg L⁻¹ DOC) and Mg²⁺ and Ca²⁺ are not far from many analytical compositions of freshwaters, the excess of metal ions should favour that most of the organic substrates will be complexed by the metal ion and, therefore its reactivity towards chlorine could be changed.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Citric acid, humic acid, resorcinol, glyceraldehyde, fructose, glucose, maltose, maltotriose, maltopentaose, histidine, propanedioic acid, fumaric acid, maleic acid, glutaric acid and adipic acid were supplied by Sigma–Aldrich. Trihalomethane calibration kit was supplied by Supelco. NaClO (10–13%), sodium thiosulfate, copper nitrate, magnesium nitrate and calcium nitrate were of analytical grade. Solutions were prepared using Milli-Q deionized water. The pH values of the model aqueous solutions have been buffered at 7.8 using sodium bicarbonate.

2.2. THM analysis

Chlorination and THM analysis for the model samples in the present study has been carried out, at least in triplicate independent chlorination experiments, according to the following procedure. Firstly 1 L of a stock solution of 2 mg L⁻¹ DOC of the corresponding substrate in Milli-Q water was prepared. The pH of the solutions was adjusted to a value of 7.0 using a 0.1-M aqueous solution of NaHCO₃ continuously monitoring the pH value with a pH-meter (Metrohm). Once the pH value was constant, aliquots of 100 mL of this parent solution were taken and the corresponding volume of the alkali metal salts or copper nitrate from a stock solution was added. No change of the pH was observed for any of the samples prepared, the value being maintained to 7.0 after addition of the salt. The solution was left to equilibrate for 3 h before adding 1 mL of 1 g L⁻¹ of NaClO. At this moment the pH of the solutions change to 7.8 and this value was maintained constantly over the time. Once chlorinated the solutions were sealed and stored in the dark at 20 °C for the appropriate time to determine kinetics of THM formation. Comparison for all the substrates was done using THM data measured at 72 h. After this time, the reaction was stopped by reducing the residual chlorine with 0.1 g of thiosulfate, adding 0.1 g of NaCl to increase the ionic strength of the solution. Free chlorine was determined by the N,N'-diethyl-1,4-phenylenediamine (DPD) method (ISO 7393-2:1985).

For the experiment using natural water instead of a model solution, a sample water from the Turia river at La Presa (Valencia, Spain) was used. The relevant physicochemical parameter of this water are the following: 145 mg L⁻¹ Ca²⁺, 37 mg L⁻¹ Mg²⁺, 300 µg L⁻¹ Br⁻, 117 mg L⁻¹ Cl⁻, pH: 7.8, 1.8 mg L⁻¹ DOC. Chlorination was performed as previously indicated and the pH value was constant at pH 7.8.

THM content was determined by purge and trap following the US EPA method 524.2 [22]. Briefly, 5 mL of the aqueous solution containing THMs were purged with a He flow (40 mL min⁻¹) for 11 min and the stream was passed through a Vocarb 3000 cartridge. After the purge, the He purge was stopped and volatile compounds trapped onto the cartridge were desorbed by heating the cartridge at 180 °C and the desorbed volatile compounds introduced in a GC–MS (Hewlett Packard HP6890 Chromatograph and mass detector Agilent 5973) with a 30-m capillary column (HP-5MS, crosslinked phenylmethylsilicone) and a quadrupole analyzer. The oven temperature of the GC was programmed from 40 °C for 5 min increasing at a rate of 8 °C min⁻¹ up to 280 °C. Calibration was made by comparing the THMs with an external standard commercial kit of known THM concentration. For all the THMs the detection limit

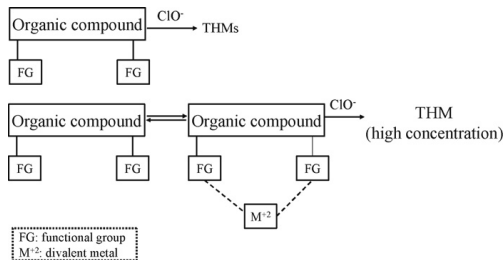
(LOD) is below 0.1 µg L⁻¹ and the precision (variation of the values for the same sample) is less than 1 µg L⁻¹.

3. Results and discussion

According to the objective of this work, herein to study the influence of divalent metal ions we selected humic and citric acids as well as polyols including monosaccharides and dicarboxylic acids of various chain lengths. We were interested in testing if the effect of THM formation enhancement by the presence of Mg²⁺ and Ca²⁺ also takes place in polyols as well as other dicarboxylic acids. Molecules containing two or more hydroxyl groups can also bind to metal ions acting as polydentate ligands [23]. Scheme 1 depicts our proposal of how the formation of THM is enhanced by complexation with Lewis metal ions and the need of suitable functional groups in the substrate.

Considering the precedents mentioned earlier, we performed a study of THM formation of model solutions of humic and citric acids in the absence and in the presence of Cu²⁺ (1 mg L⁻¹). The concentration of humic and citric acids was 2 mg L⁻¹ DOC that is similar to those used in previous work [14] and is not far from total DOC found in freshwaters [19,20]. We were able to reproduce the reported results [14] and to observe an enhancement of the THM formation due to the presence of Cu²⁺ for polyhydroxylic compounds not previously considered (see Table 1).

Following our study, we proceeded to determine the amount of THM formed from the model solutions in the presence of various concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺. These two alkali earth metals are widely present at high concentrations [21], particularly in hard natural waters. Herein we have studied two concentrations in the range typically found in hard waters (Ca²⁺ 60 and 100 mg L⁻¹; Mg²⁺ 30 and 60 mg L⁻¹) [21]. At the concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺ used here and working with HCO₃⁻ buffered solutions, the nitrate salts were totally soluble and no changes in the pH occur. The results obtained indicate that these alkali earth metal ions are effective to enhance THM formation. As it can be shown in Table 1, the presence of Mg²⁺ and Ca²⁺ enhances THM formation in polyols (particularly maltopentaose), citric and humic acids. On the contrary histidine and dicarboxylic acids are influenced less than 4 µg L⁻¹ when Mg²⁺ or Ca²⁺ is present. Even for some substrates in which the presence of Cu²⁺ produces minor THM enhancement, when Mg²⁺ and Ca²⁺ are present a stronger boost in THM formation was observed. This is the case of polyols. However, it has to be noted that the concentration of Mg²⁺ and Ca²⁺ tested (although common in natural waters) are up to two orders of magnitude higher than that of Cu²⁺. Obviously, if lower amounts of Mg²⁺ or Ca²⁺ are used the influence of their presence on THM formation is significantly smaller and frequently negligible. In the case of resorcinol, its reactivity towards chlorine is so high that there is no influence of the presence or absence of metal ions. Worth commenting are the cases of maltose and maltopen-



Scheme 1. Hypothesis to rationalize THM enhancement by metal ions.

Table 1

CHCl₃ formation and enhancement upon chlorination in the presence of metal ions. Essay conditions: 2 mg L⁻¹ DOC, 10 mg L⁻¹ free chlorine, pH 7.8, 20 °C, 72 h reaction time. The data of the table correspond to the mean value of three independent chlorination experiments. The estimated THM relative error is ±2%.

Organic substrate	CHCl ₃ (μg L ⁻¹)	Increase CHCl ₃ (μg L ⁻¹)				
		[Ca ²⁺] (mg L ⁻¹)		[Mg ²⁺] (mg L ⁻¹)		[Cu ²⁺] (mg L ⁻¹)
		60	100	30	60	
Glyceraldehyde	106.0	10.6	20.2	11.7	23.3	9.5
Fructose	88.0	5.3	7.1	7.0	7.9	13.2
Maltose	107.0	8.6	19.3	13.9	32.1	10.7
Maltotriose	122.0	4.9	15.9	18.3	26.8	13.4
Maltopentaose	125.0	7.5	16.3	17.5	40.0	12.5
Histidine	28.0	0.3	0.3	0.3	0.8	5.3
Propanedioic acid	4.0	0.0	0.12	0.2	0.4	0.4
Trans-butenedioic (fumaric acid)	7.0	0.5	0.9	0.6	0.9	0.9
Cis-butenedioic (maleic acid)	6.0	0.4	0.6	0.4	0.7	0.5
Pentanedioic (glutaric)	9.0	0.5	1.8	1.4	2.1	1.4
Hexanedioic (adipic acid)	18.0	0.2	0.5	0.9	2.5	2.9
Citric acid	52.0	13.5	21.3	28.6	45.2	38.5
Humic acids	160.0	47.5	52.7	49.6	54.4	48.0
Resorcinol	1 650.0	15.0	31.0	16.5	33.0	66.0

taose for which when 60 mg L⁻¹ of Mg²⁺ is present, the increment of CHCl₃ is 32.1 and 40.0 μg L⁻¹, respectively. Particularly, relevant due to the ubiquitous presence in water is that Mg²⁺ and Ca²⁺ promote THM from humic and citric acids up to 54.4 and 45.2 μg L⁻¹, respectively, when 60 mg L⁻¹ of Mg²⁺ is present. Nevertheless, it is worth reminding that THM formation is a process that occurs in μg L⁻¹ range, the overall amount of organic substrate converted depending on its chemical substrate. For instance it has been determined that when the starting substrates are carbohydrate the percentage typically converted in the process is well below 1% [10,12].

With respect to the influence of the concentration of alkali earth cation on the THM formation it was generally observed that the largest relative enhancement is observed when comparing the THM concentration in the absence and in the presence of the lowest concentration. Further concentration increase from 30 to 60 mg L⁻¹ for Mg²⁺ or from 60 to 100 mg L⁻¹ for Ca²⁺ only leads to an increment of about 12 μg L⁻¹ for citric acid, resorcinol and polyols (except for fructose where the increase is about 2 μg L⁻¹). Dicarboxylic and humic acids and histidine undergo an increment lower than 4 μg L⁻¹ under the same conditions.

The data shown in Table 1 refers to differences in THM formation at 72 h. In the context of determining the influence of the hardness on THM evolution it is also of interest to follow the temporal profile of THM formation to demonstrate that the THM content of hard waters is at any time higher than the THM content in the absence of Ca²⁺ and Mg²⁺ salts. Figs. 1–3 present the temporal evolution of THM in the absence or at various Mg²⁺ and Ca²⁺ concentrations. As it can be seen in these plots, for every compound and at any time the THM concentration is higher when Ca²⁺ or Mg²⁺ are present and increases with the concentration of the alkali metal ion. The plots presented in these figures firmly establish that, as previously reported for Cu²⁺, alkali earth metal ions can also promote THM formation. In some cases, as citric acid in the presence of Mg²⁺, the effect is remarkable, and almost doubles the amount of THM.

One point of interest is comparing the THM enhancement activity of the three cations under study. From the higher activity of Cu²⁺ and its general influence to all the compounds tested (including histidine), it can be concluded that this cation is the most efficient. Then, the second in efficiency appears to be Mg²⁺. This order of activity (Cu²⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺) must be a consequence of the mechanism of action of THM enhancement. THM formation is a complex mechanism that depends on the substrate. Rook and Boyce have studied in detail the mechanism for THM formation from resorcinol and β-diketones [4,24,25]. In both cases the proposed

mechanism for THM formation involves more than 10 individual steps. Also in the case of citric acid, the pathway of THM formation has been studied in some detail and it has been proposed that occurs through one initial decarboxylation followed by chlorination of the 3-oxopentadiolic intermediate [26]. For the other substrates under study (carbohydrates, polycarboxylic acids, humic acids and histidine) there are not in the literature analogous works addressing in detail the multiple steps leading to THMs. Thus, the complexity of THM formation with multiple consecutive steps makes difficult to propose how the metal cations intervene in the process. However, we suggest that the crucial step in the mechanism of action of dissolved metal ions involves an initial complexation of the metal ion with the substrate before reaction of chlorine. In this case the Lewis acidity strength of the metal ion will be the key factor enhancing THM formation. Scheme 2 illustrates that the metal ions can bind to the carboxylate groups of the substrates and by forming a complex would increase the reactivity of the substrates towards chlorination. The Lewis acidity of the cations should follow the charge density of the ions. For this reason considering the charge/ionic radius ratio (Cu²⁺, 0.73 Å, Mg²⁺, 0.72 Å, Ca²⁺, 0.99 Å) the less acidic (Ca²⁺) cation would be also the less active.

Concerning the relative efficiency of Cu²⁺ and Mg²⁺, differences in acidity strength cannot rationalize the difference in activity for THM enhancement since both cations have the same charge density. Therefore, other factors besides acidity must also play a role. We notice that in addition to Lewis acidity, Cu²⁺ can also be active as redox centre due to the existence for copper of two oxidation states. In this way, Cu²⁺ can promote elementary steps that involve redox processes besides nucleophilic additions. Since chlorine can act as electrophile and oxidizing agent, we propose that both types of processes can be catalyzed by Cu²⁺ but not for Mg²⁺ or Ca²⁺.

Nevertheless with respect to the acidity of Ca²⁺ it has to be stressed that the higher concentration typically found in water can compensate its intrinsic lower activity. Thus, as commented in Section 1, waters containing 1 mg L⁻¹ of Cu²⁺ are unusual [27], while it is very common that hard waters contain up to 150 mg L⁻¹ of Ca²⁺ [21]. Moreover, the legal limit of Cu²⁺ in drinking water is 2 mg L⁻¹ [6], while World Health Organization (WHO) even recommend the presence of calcium in drinking water for dietary reasons [28].

The above study was carried out with model solutions that were prepared with pure compounds. In this regard, it is also of interest to show that similar THM formation enhancement occurs when natural waters are submitted to chlorination in the presence of increasing amounts of alkali earth metal ions. In order to address

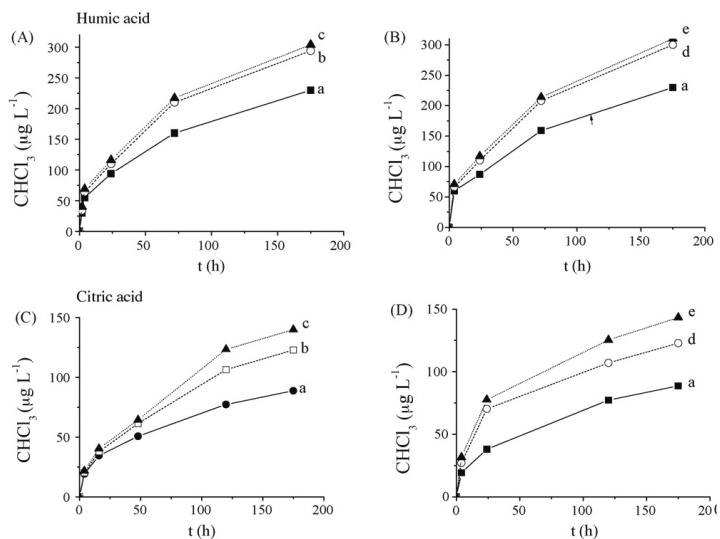


Fig. 1. Temporal evolution of CHCl_3 formation for humic (A and B) and citric (C and D) acids in the absence (a) and presence of Ca^{2+} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}) and Mg^{2+} (d: 30 mg L^{-1} , e: 60 mg L^{-1}). For reaction conditions see Section 2. The estimated error of the experimental point is $\pm 2\%$.

this point, we take samples of raw water from Turia river (Valencia, East of Spain) and proceeded to perform analogous studies on the influence of Mg^{2+} and Ca^{2+} on THM formation from this natural water. At this point it has to be noted that the raw water consists in a complex mixture of DOM [29–31] and that the water contains already a concentration of 145 and 37 mg L^{-1} of Ca^{2+} and Mg^{2+} ,

respectively. We measure the time evolution of THM formation of this natural water and compared this temporal profile with the THM evolution of the same water when additional extra amounts of Mg^{2+} and Ca^{2+} are added. The results are shown in Fig. 4. In comparison with behaviour of the model solutions shown in Figs. 1–3 in which the only THM formed was CHCl_3 (see vertical axis of Figs. 1–3) in the

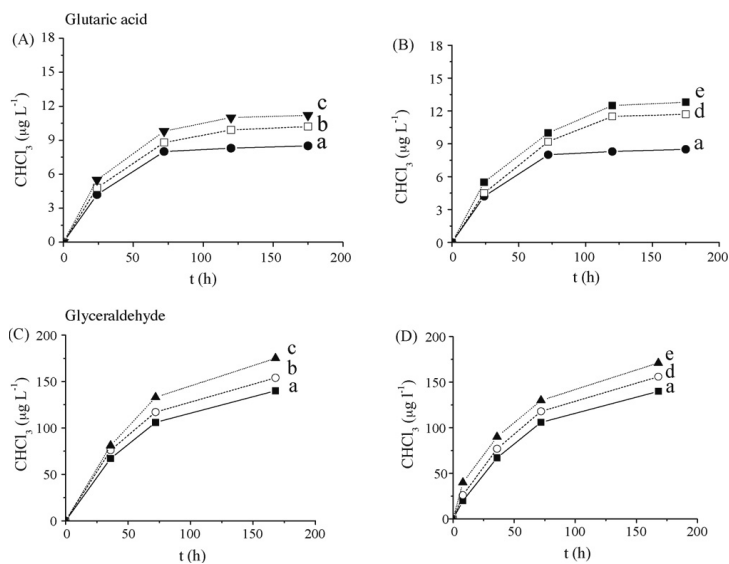


Fig. 2. Temporal evolution of CHCl_3 formation for glutaric (A and B) and glyceraldehyde (C and D) in the absence (a) and presence of Ca^{2+} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}) and Mg^{2+} (d: 30 mg L^{-1} , e: 60 mg L^{-1}). For reaction conditions see Section 2. The estimated error of the experimental point is $\pm 2\%$.

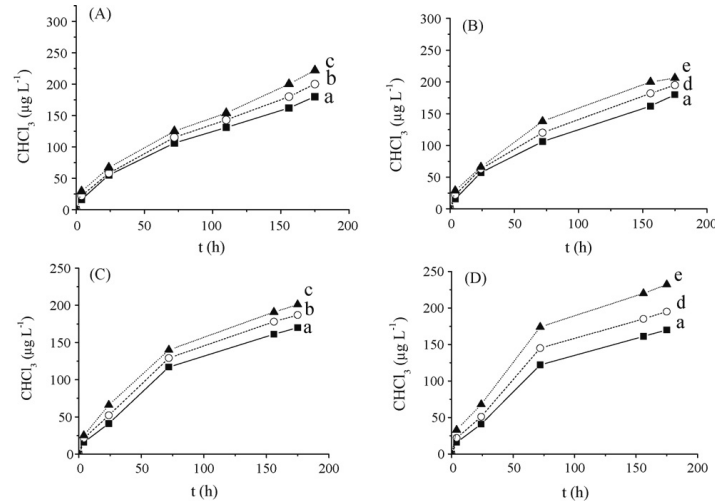
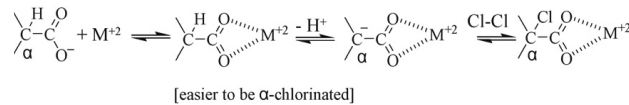


Fig. 3. Temporal evolution of CHCl_3 formation for maltose (A and B) and maltotriose (C and D) in the absence (a) and presence of Mg^{2+} (b: 30 mg L^{-1} , c: 60 mg L^{-1}) and Ca^{2+} (b: 60 mg L^{-1} , c: 100 mg L^{-1}). For reaction conditions see Section 2. The estimated error of the experimental point is $\pm 2\%$.



Scheme 2. Proposal of the influence of Lewis acidity on the chlorination of carboxylic acids.

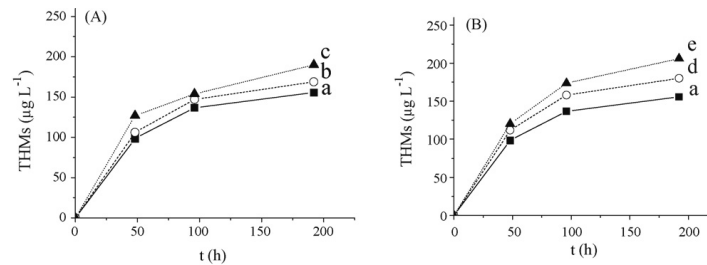


Fig. 4. Time evolution of THM formation in Turia river water (A and B) without addition (a) and upon addition of Ca^{2+} (b: 60 mg L^{-1} ; c: 100 mg L^{-1}) and Mg^{2+} (b: 30 mg L^{-1} ; c: 60 mg L^{-1}). Reaction conditions: 1.8 mg L^{-1} DOC, 10 mg L^{-1} free chlorine, pH 7.8, 20°C . Note that natural water already contains Ca^{2+} and Mg^{2+} (see text). The estimated error of the experimental point is $\pm 2\%$.

case of natural water the presence of bromide (see Section 2) causes the formation of brominated THM. The data point presented in Fig. 4 corresponds to the total amount of THMs. The THM increase, at final time (8 days), when Ca^{2+} is present at 60 and 100 mg L^{-1} is 13.9 and $34.0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. If Mg^{2+} is added to the natural water at 30 and 60 mg L^{-1} the THM increase, at final time (8 days), is 24.7 and $50.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The different increase of each individual THMs (see Table S1 in Supplementary Material), in $\text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, is up to 22 for CHCl_3 , 21 for CHBrCl_2 , 7 for CHClBr_2 and 3 for CHBr_3 . As it can be seen although all the THMs are affected by the presence of the alkali earth metal ions, CHCl_3 and CHBrCl_2 are influenced in a larger extent. Therefore, the above results show that also for natural waters the presence of additional Mg^{2+} and Ca^{2+} concen-

trations produce and enhance THM formation. Moreover, this enhancement correlates with the additional concentration of Mg^{2+} and Ca^{2+} . In other words, also for natural waters the effect that we have observed with model solutions takes place: THM formation for natural waters is also increased when Mg^{2+} and Ca^{2+} are added to these solutions.

4. Conclusions

In summary, the results presented show that Mg^{2+} and Ca^{2+} , two ubiquitous alkali earth metal ions, at concentrations that can be found in hard waters act as promoters of THM formation. THM promotion of dissolved metal ions follows the order $\text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$.

The lower activity of Ca^{2+} can be over-compensated by its higher natural abundance. Using model solutions, we have shown that the effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} enhancing THM formation strongly depends on the chemical structure, polyols, citric and humic acids are particularly influenced. On the contrary THM formation is not much influenced by Mg^{2+} and Ca^{2+} in the cases of histidine, resorcinol and dicarboxylic acids. Our results are relevant in the context of drinking water quality and shows that hard waters containing Mg^{2+} and Ca^{2+} are more prone to produce higher THM values than soft waters containing analogous organic compounds.

Acknowledgements

Financial support by the Spanish DGI (CTQ 2006-06859) is gratefully acknowledged. SN thanks the Universidad Politécnic de Valencia for an assistant professor contract (programa Cantera).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.031.

References

- [1] L. Attias, A. Contu, A. Loizzo, M. Massiglia, P. Valente, G.A. Zapponi, Trihalomethanes in drinking water and cancer: risk assessment and integrated evaluation of available data, in animals and humans, *Sci. Total Environ.* 171 (1995) 61–68.
- [2] T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg, R.C. Kroner, Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, *J. Am. Water Works Assoc.* 66 (1994) 703–706.
- [3] J.J. Rook, Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *Water Treat. Examin.* 23 (1974) 234–243.
- [4] J.J. Rook, Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of humic acids and resorcinol, in: R.L. Jolley, W.A. Brungs, R.B. Cumming (Eds.), *Water Chlorination: Environmental Impact Health Effects*, vol. 3, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, 1980, pp. 85–98.
- [5] United States Environmental Protection Agency, Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, Washington, DC, USA, EPA/630/P-03/001, 2005.
- [6] European Union, Council directive 98/83/EC of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Commun. L* 330 (1998) 32–54.
- [7] United States Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection By-products, Final Rule, Washington, DC, USA, 1998, pp. 69390–69476.
- [8] W.J. Cooper, R.G. Zika, M.S. Steinhauer, Bromide-oxidant interactions and THM formation: a literature review, *J. Am. Water Works Assoc.* 77 (1985) 116–121.
- [9] S.W. Krasner, M.J. Scrimanti, E.G. Means, Quality degradation: implications for DBP formation, *J. Am. Water Works Assoc.* 86 (1994) 34–47.
- [10] M. Deborde, U.V. Gunten, Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment—Kinetics and mechanisms: a critical review, *Water Res.* 42 (2008) 13–51.
- [11] J.M. Symons, S.W. Krasner, M.J. Scrimanti, L.A. Simms, H.W.J. Sorensen, G.E.J. Speitel, A.C. Diehl, Influence of bromide ion on trihalomethane and haloacetic acid formation, in: R.A. Minear, G.L. Amy (Eds.), *Disinfection By-products in Water Treatment: The Chemistry of their Formation and Control*, CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1996, pp. 91–130.
- [12] T. Nobukawa, S. Sanukida, Effect of bromide ions on genotoxicity of halogenated by-products from chlorination of humic acid in water, *Water Res.* 35 (2001) 4293–4298.
- [13] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl- and Br- on trihalomethane formation potential, *Water Res.* 42 (2008) 3990–4000.
- [14] E.R. Blatchley, D. Margetash, R. Duggirala, Copper catalysis in chloroform formation during water chlorination, *Water Res.* 37 (2003) 4385–4394.
- [15] J.Q. Bo Li, L. Huijuan, C. Hu, Effects of copper(II) and copper oxides on THMs formation in copper pipe, *Chemosphere* 68 (2007) 2153–2160.
- [16] V.P. Utgikar, N. Chaudhary, A. Koeniger, H.H. Tabak, J.R. Haines, R. Govind, Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper, *Water Res.* 38 (2004) 3651–3658.
- [17] T. Dudev, C. Lim, Effect of carboxylate-binding mode on metal binding/selectivity and function in proteins, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 85–93.
- [18] P.G. Daniele, C. Foti, A. Gianguzza, E. Prenci, S. Sammartano, Weak alkali and alkaline earth metal complexes of low molecular weight ligands in aqueous solution, *Coord. Chem. Rev.* 252 (2008) 1093–1107.
- [19] G.R. Aiken, A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances, in: F.H. Frimmel, R.F. Christman (Eds.), *Humic Substances and their Role in the Environment*, Wiley Environment, Wiley, New York, 1988, pp. 15–30.
- [20] J.M. Symons, R. Xia, A.C. Diehl, G.E. Speitel Jr., C.J. Hwang, S.W. Krasner, S.E. Barrett, The influence of operational variables on the formation of dissolved organic halogen during chloramination, in: R.A. Minear, G.L. Amy (Eds.), *Water Disinfection and Natural Organic Matter: Characterization and Control*, ACS Symposium Series 649, American Chemical Society, Washington, DC, 1996, pp. 78–104.
- [21] World Health Organization, Guidelines for Drinking-water Quality, 4th ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2008.
- [22] US EPA, Method 524.2: Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry, US EPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [23] B. Gyuresik, L. Nagy, Carbohydrates as ligands: coordination equilibria and structure of the metal complexes, *Coord. Chem. Rev.* 203 (2000) 81–149.
- [24] S.D. Boyce, J.F. Hornig, Formation of chloroform from the chlorination of diketones and polyhydroxybenzenes in dilute aqueous solution, in: R.L. Jolley, W.A. Brungs, R.B. Cumming (Eds.), *Water Chlorination: Environmental Impact Health Effects*, vol. 3, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, 1980, pp. 131–140.
- [25] S.D. Boyce, J.F. Hornig, Reaction pathways of trihalomethane formation from the halogenation of dihydroxyaromatic model compounds for humic acid, *Environ. Sci. Technol.* 17 (1983) 202–211.
- [26] R.A. Larson, A.L. Rockwell, Citric acid: potential precursor of chloroform in water chlorination, *Naturwissenschaften* 65 (1978) 490.
- [27] Agency for toxic substances and disease registry, Toxicological Profile for Copper, <http://www.eco-usa.net/toxics/copper.shtml>, 1990.
- [28] World Health Organization, Nutrient minerals in drinking-water and the potential health consequences of long-term consumption of demineralized and remineralized and altered mineral content drinking-waters, in: *Guidelines for Drinking-water Quality*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2004.
- [29] J. Buffle, F.L. Greter, W. Haerdi, Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes, *Anal. Chem.* 49 (1997) 216–222.
- [30] M. Schnitzer, S.U. Khan, *Humic Substances in the Environment*, Marcel Dekker, New York, USA, 1972.
- [31] F.J. Stevenson, *Humus Chemistry Genesis, Composition Reactions*, Wiley Interscience, New York, USA, 1982.

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: Product study of the reaction of three β -lactam antibiotics with ClO_2

Sergio Navalon¹, Mercedes Alvaro¹, Hermenegildo Garcia*

Department of Chemistry, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2007

Received in revised form

14 November 2007

Accepted 19 November 2007

Available online 24 November 2007

Keywords:

Chlorine dioxide

Water treatment

Trihalomethane formation

β -Lactam antibiotics in water

Emergent pollutants in water

ABSTRACT

This work deals with the chlorine dioxide (ClO_2) reactivity with three representative β -lactam antibiotics (penicillin, amoxicillin and cefadroxil) that can be present in natural aquatic resources. Due to the wide use of ClO_2 as disinfection agent our work is of interest to determine the fate of these antibiotics during the water treatment process. Our study shows that antibiotics react stoichiometrically with ClO_2 because increasing amounts of ClO_2 lead to increasing antibiotic disappearance. Concerning the influence of antibiotic structure, penicillin reacts sluggishly with ClO_2 , whereas amoxicillin and cefadroxil are highly reactive at either neutral or basic pH. For both reactive antibiotics, hydroquinone together with a wide range of 4-substituted phenols were detected as products. Pretreatment with ClO_2 before chlorination of aqueous solutions of antibiotics reduces the trihalomethane formation as compared with analogous chlorination without ClO_2 pretreatment.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There is an increasing concern about the presence of pharmaceutically active drugs in water resources due to their adverse effects on human health upon continued ingestion (Richardson and Bowron, 1985; Heberer and Stan, 1996; Hirsch et al., 1999). It has been shown that conventional urban sewage treatment does not completely remove the most widely used therapeutic drugs (Ternes, 1998; Ternes et al., 2002; Carballa et al., 2004; Stackelberg et al., 2004; Bendz et al., 2005) and control analyses reveal their presence downstream of conventional wastewater treatment plants. There is also an increasing concern by the occasional detection of therapeutic drugs in underground water resources caused by urban waste water infiltration.

Chlorine dioxide (ClO_2) is one of the disinfectant agents used in water treatment plants as an alternative to chlorine (Aieta

and Berg, 1986; Myers, 1990; White, 1998; Rav-Acha, 1998). One of the major advantages of ClO_2 over chlorine is the reported inability of ClO_2 to form trihalomethanes (THMs) (Lykins and Griese, 1986; McVeigh et al., 1985). Current European regulations (EU, 1998) limits THM content in drinking waters and in order to minimize THM formation the use of chlorine in disinfecting water treatment is being reduced and replaced by alternative disinfection agents worldwide.

In view of the increasing use of ClO_2 in water treatment, it is of interest to determine the reactivity of this disinfectant agent with organic compounds that could be present in water resources (Huber et al., 2005). More specifically, it is of interest to gain information about the reaction of ClO_2 with highly consumed pharmaceutical drugs that have been detected in groundwater, because some of the resulting products can have an adverse biological effect. It is particularly relevant to determine the consequences of chronic, low-level dosage to

*Corresponding author. Tel.: +34 96 387 78 07; fax: +34 96 387 78 09.

E-mail addresses: sernaol@doctor.upv.es (S. Navalon), malvaro@qim.upv.es (M. Alvaro), hgarci@qim.upv.es (H. Garcia).

¹ Tel.: +34 96 387 7007; fax: +34 96 387 9349.

0043-1354/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2007.11.023

the products derived from ClO_2 reaction with some common pharmaceutical drugs.

In this context, the present work studies the reactivity of ClO_2 with three of the bestselling β -lactam antibiotics under conditions that can be of some relevance in water treatment. In particular, we have studied the stoichiometry of the reaction between these antibiotics and ClO_2 to determine whether ClO_2 can catalytically decompose this type of antibiotics under aerobic conditions. It is also important to characterize the resulting reaction products and the effects of ClO_2 on THM formation from these antibiotics.

Considering the extensive use of ClO_2 in drinking water treatment plants, our work demonstrates that ClO_2 does affect the stoichiometric degradation of antibiotics, transforming them into other derivatives and occasionally reducing the THM content of the treated water.

2. Experimental

2.1. Materials

Penicillin G potassium salt (PEN), amoxicillin (AMO), cefadroxil (CEF) and *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 10% trimethylchlorosilane (BSTFA+10% TMCS) were supplied by Sigma-Aldrich. Tris(*p*-bromophenyl)ammonium hexafluoroantimonate ($\text{TPA}^+\text{AsF}_6^-$) was supplied by Scharlab. The other reagents used were of analytical or HPLC grade.

2.2. Product identification

Prior to the analysis, the reaction mixture containing the antibiotic and the corresponding amount of ClO_2 was quenched for the required time using an excess of thiosulphate with respect to ClO_2 . Then, antibiotic disappearance was determined by reverse-phase HPLC (Waters 600 Series adapted to a photodiode array detector) using a Kromasil-C18 column under isocratic conditions. PEN (25 ppm) was analysed using 20% acetonitrile and 80% water (pH 3; 1% acetic acid) as mobile phase. In the case of AMO (1.6 ppm) and CEF (1.89 ppm) the eluent was 10% methanol and 90% water (pH 4.8; 0.02 M KH_2PO_4). In both cases the flow was 0.9 mL/min and the injection volume was 200 μL . The detection limit depends on the absorbance of each antibiotic at the monitoring wavelength (PEN 225 nm and AMO and CEF 229 nm). The detection limit for PEN, AMO and CEF was 5, 0.5 and 0.5 ppm, respectively. For product identification the reaction mixtures were acidified to pH 2 with HCl, concentrated at 40 °C and lyophilized. The residue was suspended in BSTFA+ 10% TMCS and the solution stirred at 80 °C for 8 h. The resulting silylated mixture was dissolved in anhydrous acetonitrile, filtered through a 0.45 μm membrane and injected in a gas chromatography (GC)–MS system (Hewlett Packard HP6890 Chromatograph and mass detector Agilent 5973). The capillary column (30 m) contains crosslinked (5%) phenylmethylsilicone (HP-5MS) as stationary phase. It was used as a carrier gas (1.2 mL/min). The injection volume was 1 μL . The injection and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively. The oven temperature programme starts at 50 °C for 3 min, then it increases at a rate of 8 °C/min up to 90 °C, maintains

this temperature for 2 min and subsequently rises again at a rate of 15 °C/min up to 280 °C for 10 min.

Product identification was done using the mass spectra of the silylated derivative present in the reaction mixture. Penillic acid was identified by comparison of the chromatographic retention time, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR (recorded on a Varian Gemini 3000, 300 MHz) as well as ESI-MS spectroscopic data with those of an authentic sample prepared by acid hydrolysis of PEN. The transformation of PEN into penillic acid has been reported in the literature (Kessler et al., 1983). *N*-(2-phenylacetyl) glycine was identified through the alternative synthesis of this product obtained by reacting glycine and phenylacetyl chloride and comparing the retention time of the synthesized product with that present in the reaction with ClO_2 .

The mass spectra of the silylated products recorded in the present work are given as Supplementary information.

THM content was determined by GC-ECD (Carlo-Erba 8139 chromatograph with ECD coupled to a Thermo Finnigan autosampler HS 2000) following the procedure of the UNE-EN ISO 10301 standard. In all cases, the almost exclusive THM detected was chloroform, this being in agreement with the lack of bromine atoms in the synthetic waters used. GC for THM analysis was performed using He as carrier gas (85 kPa), and N_2 as make-up gas (110 kPa) in a DB.624 capillary column, injecting 0.4 mL of the head gas. The injection and detector temperatures were 220 and 330 °C, respectively. The oven temperature programme started at 50 °C for 1 min, then increased at a rate of 3 °C/min up to 180 °C and subsequently at a rate of 10 °C/min up to 210 °C. For THM analysis, sealed vials (20 mL) containing 10 mL of the water sample chlorinated at 10 ppm with a stock solution of NaClO (1000 ppm) were sealed and stored in the dark at 20 °C for 24 h.

After this time the reaction was stopped, reducing the residual chlorine with 0.1 g of thiosulphate and adding 0.1 g of NaCl. The stock NaClO solution was prepared by diluting commercial NaClO (10–13%). Free chlorine was determined by the *N,N'*-diethyl-1,4-phenylenediamine (DPD) method (ISO 7393-2:1985).

2.3. Reaction conditions and procedure

Three commercially available antibiotics with a β -lactam structure were selected as probes to study their reactivity with ClO_2 . The reactions were carried out in buffered water (pH 7; $\text{HCO}_3^-/\text{HCl}$) at thermostated temperature (20 °C) containing 25 (PEN), 1.6 (AMO) and 1.89 ppm (CEF) of the drugs. Although these concentrations are considerably larger than those expected in water resources (0.1 ppm) (Huang et al., 2001) we have tried to keep them as low as possible while still allowing product characterization by chromatography. The reactions were carried out in triplicate and the results shown correspond to the average of the individual runs. In general, variations among individual runs were lower than 5%.

ClO_2 was generated by reacting potassium chlorate and hydrogen peroxide in sulphuric acid (Eq. (1)). The resulting gas was collected in water and the resulting concentrated aqueous ClO_2 solution was titrated by measuring the optical absorption (Perkin-Elmer's Lambda 35 UV/Vis) of the solution at 360 nm (for $\text{ClO}_2 \epsilon_{360} = 1250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) after buffering at pH 7. ClO_2 production was checked for the absence of significant

chlorine concentration by titration before and after treatment with glycine, which is a selective reagent for chlorine.



Corresponding volumes of this ClO_2 stock solution were added to the antibiotics under study dissolved in water, controlling the initial ClO_2 /substrate molar ratio at the required value (between 0.1 and 3). The reaction was observed by monitoring ClO_2 concentration using optical spectroscopy (PEN) or DPD colorimetric titration (AMO and CEF). This difference in the ClO_2 analytical method was due to the absorbance of the reaction products derived from AMO and CEF at 360 nm. At the same time as ClO_2 , antibiotic concentration was determined in the three cases by HPLC analysis of the aqueous solution. At the end of the reaction the mixture was concentrated and exposed to exhaustive silylation using a BSTFA+10% TMCS mixture, at 80 °C before GC-MS analysis of the resulting products. Scheme 1 illustrates the protocol used to perform the reaction of ClO_2 with β -lactam antibiotics.

Several ClO_2 /substrate molar ratios were assayed to determine the stoichiometry of the reaction and to find out whether or not catalytic ClO_2 amounts can affect antibiotic degradation to a significant extent. Some experiments were purposely performed at acidic or basic pH to determine the relative proportion between reaction and spontaneous disappearance for ClO_2 . ClO_2 is a disinfecting agent that exhibits low persistence in water. Moreover, the stability of ClO_2 aqueous solutions is strongly dependent on pH and, therefore, ClO_2 disappearance cannot completely be associated in its reaction with the β -lactam antibiotic.

3. Results and discussion

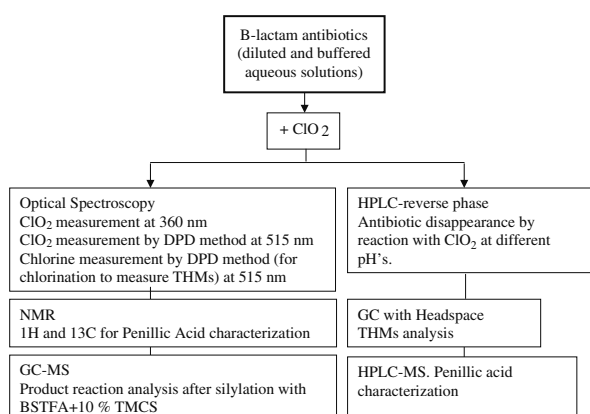
3.1. Reaction of ClO_2 with PEN

At pH 7, PEN reacts sluggishly with ClO_2 . The reactivity of ClO_2 towards PEN even decreases further as pH increases in the

range of 7–9 units. In contrast to this lack of reactivity at neutral or basic pH, ClO_2 attacks PEN at acidic pH values. We have studied the reactivity in the pH range between 3.5 and 6.4 units. The tendency observed is that the reaction rate and PEN disappearance increase progressively as the pH value decreases. Fig. 1(a) shows the percentage of PEN disappearance versus the concentration of ClO_2 added when the reaction is conducted at pH 3.5.

As it can be seen there, the reaction at this acidic pH value seems to exhibit a 1:1 stoichiometry, proportionally increasing the percentage of PEN disappearance after 2 h reaction with the ClO_2 dose. The kinetics of the reaction of PEN with ClO_2 at three different pH values in the range 3.5–6.4 was studied by observation of the time conversion plot. Figs. 1(b) and 2 show ClO_2 concentration and percentage of PEN disappearance versus time. In these plots, the results of two control experiments, namely the spontaneous disappearance of ClO_2 and PEN at their corresponding pH values, have also been included. These blank controls show that about 10% PEN decomposes spontaneously in the absence of ClO_2 in this pH range. Similarly, ClO_2 is stable in this pH range for the time interval of PEN reaction. In contrast to the blank controls, the reaction of PEN with ClO_2 , characterized by the initial reaction rate and the percentage of disappearance at 60 min reaction time, was strongly dependent on pH. The maximum initial reaction rate and percentage of PEN disappearance at 100 min time is obtained at the lowest pH, while at higher pH values the decay of ClO_2 concentration is not coupled with a concomitant increase in the percentage of PEN disappearance. At high pH values most ClO_2 disappears in the presence of β -lactam, while the concentration of the antibiotic remains unaltered. Apparently the β -lactam is playing the role of an organocatalyst promoting ClO_2 decomposition but without reacting itself in the same extent.

The product formed upon reaction of PEN with ClO_2 was characterized by spectroscopic means including ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopy and HPLC-MS. The data indicate that the



Scheme 1 – Procedure for the analysis of the reaction products resulting from ClO_2 treatment of antibiotics.

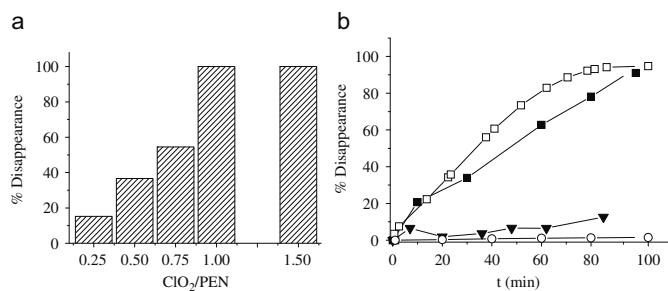


Fig. 1 – PEN disappearance by ClO₂ at pH = 3.5 after 2 h of reaction (a). Time-conversion plot for the reaction of PEN with one equivalent ClO₂ at pH 3.5 (b). ▼: Disappearance of PEN in the absence of ClO₂. ■: PEN disappearance by reaction with ClO₂. □: ClO₂ consumption in the presence of PEN. ○: Disappearance of ClO₂ in the absence of PEN.

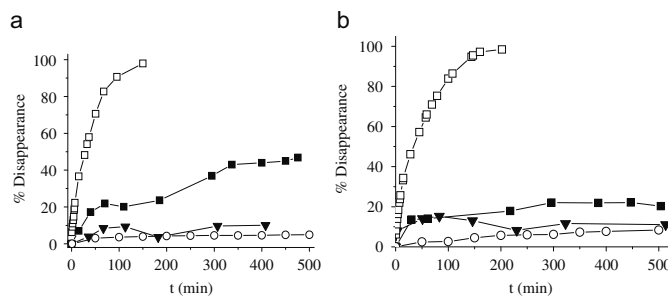
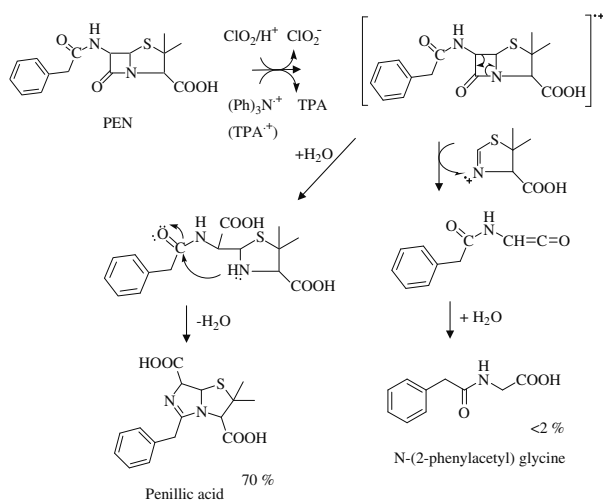


Fig. 2 – Time-conversion plot for the reaction of PEN with one equivalent ClO₂ at pH 5.4 (a) and at pH 6.4 (b). ▼: Disappearance of PEN in the absence of ClO₂. ■: PEN disappearance by reaction with ClO₂. □: ClO₂ consumption in the presence of PEN. ○: Disappearance of ClO₂ in the absence of PEN.



Scheme 2 – Reaction and proposed mechanism of PEN promoted by ClO₂ or TPA⁺.

predominant product was penillic acid accompanied with small quantities of *N*-(2-phenylacetyl) glycine (Scheme 2). It is worth noting that penillic acid (but in much lower percentages) is also formed in the absence of ClO_2 due to the disappearance of PEN at acidic pH values. The possibility for penillic acid to result from purely acid reactions even in the presence of ClO_2 was rejected based on the previously commented blank controls at pH 3.5 in which minor spontaneous PEN disappearance occurs.

Concerning the mechanism of the reaction between PEN and ClO_2 , which we have shown to react with a 1:1 stoichiometry, one possible explanation reported in the literature is the occurrence of an initial electron transfer from PEN as donor to ClO_2 as acceptor (Rav-Acha, 1998). Subsequently PEN's radical cation undergoes further transformations (see below). To provide some experimental support to this mechanism, PEN was also made to react at pH 7 with $\text{TPA}^{++}\text{AsF}_6^-$, which is a well-known single-electron acceptor reagent (Bell et al., 1969). In the presence of $\text{TPA}^{++}\text{AsF}_6^-$ as electron acceptor we observed again a complete conversion of PEN to penillic acid, as indicated in Scheme 2.

Based on the reactivity of PEN with TPA^{++} and the known ability of ClO_2 to act as single-electron acceptor reagent, we consider that penillic acid is formed following the reaction mechanism shown in Scheme 2.

N-(2-phenylacetyl) glycine results from the [2+2] cycloreversion of the β -lactam ring generating a ketene intermediate that after hydration will give the carboxylic acid (Scheme 2).

3.2. Reaction of ClO_2 with AMO and CEF

We extended our study to two other bestselling β -lactam antibiotics that are among the emerging water contaminants, namely AMO and CEF. The chemical structures of AMO and CEF are drawn in Scheme 3. Their common main difference with PEN is the presence of two highly reactive moieties, i.e. a primary amino group and a phenolic ring. Therefore, a higher reactivity towards to ClO_2 could be anticipated.

We proceeded in the same way as above to determine the stoichiometry of the reaction between ClO_2 and AMO or CEF. Fig. 3 shows a bar plot presenting the percentage of antibiotic disappearance at pH 8 as a function of the number of ClO_2 equivalents added to the reaction medium. From these data it can be concluded that the stoichiometry of the reaction, of these two antibiotics, also is 1 mol of ClO_2 reacting with 1 mol of these two β -lactamic compounds.

The time conversion of the reactions of AMO and CEF with ClO_2 was also studied at different pH values. Fig. 4 shows the time profiles of ClO_2 consumption and antibiotic disappearance versus the reaction time at pH 4. Both AMO and CEF antibiotics behave similarly in all the pH range studied and exhibit the same 1:1 stoichiometry. Interestingly, AMO and CEF show different reactivity with pH from that of PEN. Thus, while acidic pH values are required to observe reaction with PEN, AMO and CEF do not decompose completely in the presence of ClO_2 at acidic pH and they only reach high conversions at pH 8 (100% conversion in less than 4 min, time-conversion plot not shown). The relevance of the influence of pH on the reactivity with ClO_2 is that while PEN should not react with ClO_2 in the process of water treatment, both AMO and CEF will be readily and completely transformed by ClO_2 under the conditions of ClO_2 disinfection.

These results, particularly the significant differences in reactivity, can be explained by the structural differences between PEN on the one hand and AMO and CEF on the other. We consider that the common 2-(4-hydroxyphenyl)-2-aminoacetyl moiety present in AMO and CEF are responsible for this behaviour. On the one hand, the presence of a hydroxy group on the aromatic ring increases the overall reactivity of AMO and CEF, while the presence of a basic amino group that will be protonated at acidic pH strongly disfavours the reaction of AMO and CEF at low pH values. Scheme 3 illustrates the proposal to rationalize the different behaviour to pH between AMO and CEF and PEN.

The reaction products were determined under those conditions in which ClO_2 reacts completely with the two β -lactam

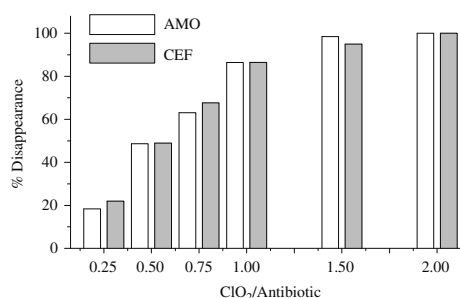
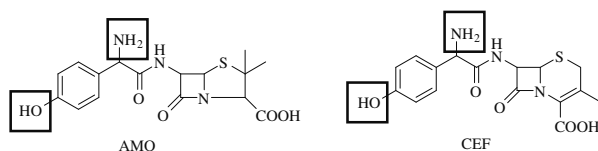


Fig. 3 – Stoichiometry of the reaction at pH 8 between ClO_2 and β -lactam antibiotics after 1 min reaction.



Scheme 3 – Structures of AMO and CEF and reactive sites with ClO_2 highlighted in squares. The amino group is an unreactive site at low pH and a reactive site at basic pH. Hydroxyl group increases the overall reactivity of the phenyl ring at any pH.

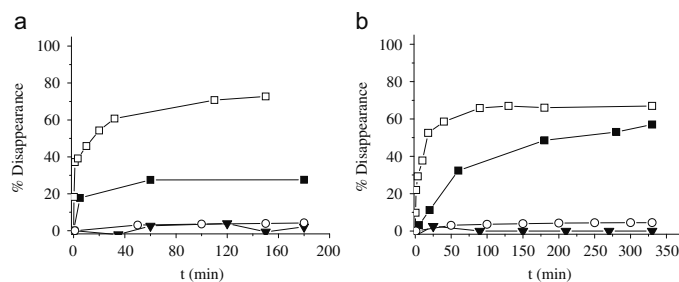
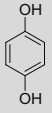
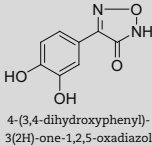
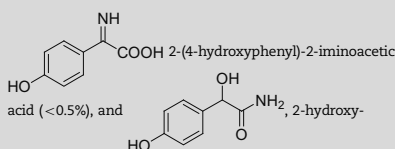


Fig. 4 – Time-conversion plot for the reaction of AMO (a) and CEF (b) (1 ppm TOC) with ClO_2 (2 ClO_2 to substrate) at pH 4 and room temperature. ∇ : Disappearance of antibiotic in the absence of ClO_2 . \blacksquare : Disappearance of antibiotic by reaction with ClO_2 . \square : ClO_2 consumption in the presence of antibiotic. \circ : Disappearance of ClO_2 in the absence of antibiotic.

Table 1 – Products detected (and their percentages) in the reaction of AMO and CEF with ClO_2 (substrate to ClO_2 ratio 1:2) at different pHs values^a

		
AMO pH 8, 10 ppm	8	0
AMO pH 8, 100 ppm	2	6
AMO pH 4, 100 ppm ^b	3	0.5
CEF pH 8, 10 ppm	13.4	0
CEF pH 8, 100 ppm	2.5	4
CEF pH 4, 100 ppm	1	1.5



2-(4-hydroxyphenyl)acetamide (<0.5%), were also detected.

^a The disappearance of initial materials was complete. Other unidentified products were also observed by GC-MS after silylation. The possibility that some reaction products are not detectable by GC is likely.

^b Detected compounds for the reaction of AMO at pH 4 and 100 ppm.

cation will evolve into a radical by N-H deprotonation. This radical can couple with ClO_2 , oxygen or other radical-like oxygen species to form hydroxylamine and hydroxylamines. Thus, four of the products observed result from the functionalization of the benzylic amino group. Eventually, all these derivatives will end up in hydroquinone.

3.3. Influence of ClO_2 pre-treatment on THM formation

One of the main advantages of the use of ClO_2 as a disinfectant agent in water treatment is the reduction of THM content with respect to conventional treatments based on the extensive use of chlorine (Rav-Acha, 1998). Therefore, it is of interest to determine whether pre-treatment of the three antibiotics under study with ClO_2 results in a reduction of THM formation. Considering our previous product determination upon reaction of antibiotics with ClO_2 we want to correlate the reactivity of ClO_2 with antibiotics to any variation in THM content.

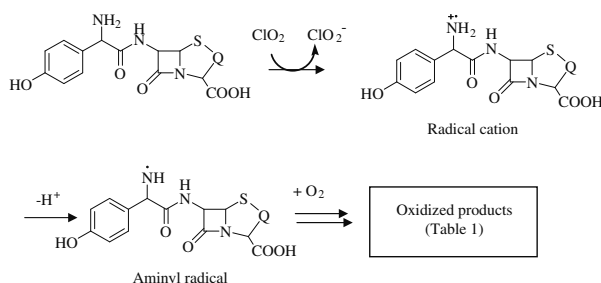
In order to analyse the influence of ClO_2 pre-treatment on THM formation, aqueous solutions of the antibiotics in Milli-Q water at pH 8 and at 1 or 2 ppm concentration were prepared and treated with different doses of ClO_2 . After disappearance of ClO_2 , the samples were chlorinated and THM formation after 24 h at 20 °C was measured. The results obtained are summarized in Table 2.

We observed that the addition of ClO_2 at pH 8 in various doses does not influence THM formation when PEN is treated with chlorine. This result is consistent with the lack of ClO_2 reaction with PEN at pH 8 commented above.

By contrast, both AMO and CEF reduce THM formation if they are previously treated with ClO_2 at pH 8. The higher the dose of ClO_2 , the higher the reduction percentage of THM. This reduction in THM formation after ClO_2 treatment was observed at the two concentrations of antibiotics under study, indicating that THM reduction by ClO_2 pre-treatment is a general phenomenon. Also remarkable is the fact that THM formation strongly depends on the nature of the antibiotic. AMO and CEF having a phenolic substructure are the antibiotics giving the highest THM content. On the other hand, PEN, unreactive with ClO_2 , is also highly reluctant to form THMs. Furthermore, pre-treatment with ClO_2 does not affect the THM value of PEN-containing waters.

antibiotics (pH 8). Product identification was based on the MS spectra of the reaction mixture after silylation with BSTFA+TMCS. Table 1 shows the products characterized in the reaction of AMO and CEF with ClO_2 .

A likely reaction mechanism compatible with all the available data is indicated in Scheme 4. In both cases, the reaction starts by single-electron transfer from the lone electron pair of the amino group to ClO_2 , forming the corresponding radical cation and chlorite. This aminyl radical



Q

AMO: C(CH₃)₂CEF: CH₂-C(CH₃)₂**Scheme 4 – Proposed mechanism for the reaction of AMO and CEF with ClO₂.****Table 2 – THM formation upon chlorination (10 ppm) at 20 °C of antibiotic synthetic water (TOC, 2 and 1 ppm) at pH = 8**

	ClO ₂ /antibiotic molar ratio reduction	THMs (ppb)	% THM
AMO (2 ppm TOC)	0	27.1	–
	3	25.1	7.6
	7.5	17.5	35.6
	8	13.4	46.2
AMO (1 ppm TOC)	0	23.9	–
	0.35	14.3	40
	0.75	15.3	36
	1	16.4	32
	4	14.1	41
	8	10	59
CEF (1 ppm TOC)	0	47	–
	0.35	47.2	3.3
	0.75	42.4	6.2
	1	42.2	10.2
	2	43.4	7.7
	4	38.2	10.1
CEF (2 ppm TOC)	8	42.5	9.6
	0	63.5	–
	4	47.8	24.8
	8	30.6	51.9
PEN (2 ppm TOC)	0	10.3	–
	1	10.7	0
	2	12	0
	4	10.3	0
	6	10.44	0
	8	14.68	0

Contact time 3 h for ClO₂ and 24 h for ClO₂⁻.

The previous results about THM formation can be explained by the fact that ClO₂ reacts with the original molecule giving rise to decomposition products. The higher the ClO₂ dose, the

higher the decomposition of the initial antibiotic because as, we have demonstrated, they react stoichiometrically.

Then, if after treatment with ClO₂, chlorine is added the tendency to form THMs (measured in ppb) is significantly reduced simply because ClO₂ has already reacted and degraded the most reactive part of the antibiotic. Worth noting is the fact that THM (ppb) corresponds only to a very small fraction of TOC (ppm). Thus, our study sheds light about the mechanism of action of ClO₂ and why this disinfectant agent is effective in reducing the THM content of treated water in those cases in which ClO₂ reacts.

4. Conclusions

In the present work, we have shown that under conditions similar to those used for drinking water treatment (pH 8 and diluted concentrations):

1. ClO₂ reacts stoichiometrically with AMO and CEF but not with PEN.
2. In the case of AMO and CEF, product isolation shows the formation of phenolic compounds in which the β-lactam ring has been degraded.
3. When chlorine is added after ClO₂ treatment, a reduction in THM value is observed in those cases in which ClO₂ reacts.
4. Overall, the above results are relevant in the understanding of how ClO₂ reacts with drugs that are emerging water pollutants.
5. This work raises the question about how the by-products resulting from antibiotics may affect consumers and microorganism resistance to antibiotics.

Acknowledgements

Financial support by the Spanish DGI (Project CTQ06,0658) is gratefully acknowledged. S.N. also thanks the Technical University of Valencia for a contract (Programa Cantera).

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.watres.2007.11.023

REFERENCES

- Aieta, E.M., Berg, J.D., 1986. A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *J. Am. Water Works Assoc.* 78 (6), 62–72.
- Bell, F.A., Ledwith, A., Sherrington, D.C., 1969. Cation-radicals: tris(*p*-bromophenyl)ammonium perchlorate and hexachloroantimonate. *J. Am. Chem. Soc. C* (19), 2719–2720.
- Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoeje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122 (3), 195–204.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llombart, M., Garcia-Jares, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Res.* 38 (12), 2918–2926.
- EU, 1998. Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official J. Eur. Commun. L* 330, 32–54.
- Heberer, T., Stan, H.J., 1996. Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water. *Vom Wasser* 86, 19–31.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225 (1,2), 109–118.
- Huang, C.H., Renew, J.E., Smeby, K.L., Pinkston, K., Sedlak, D.L., 2001. Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. In: *Proceedings of the Second International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*, National Ground Water Association, Minneapolis, MN, October.
- Huber, M.M., Korhonen, S., Ternes, T.A., von Gunten, U., 2005. Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. *Water Res.* 39 (15), 3607–3617.
- Kessler, D.P., Cushman, M., Ghebre-Sellassie, I., Knevel, A.M., Hem, S.L., 1983. Investigation of a proposed penicillin G acidic degradation scheme using high-pressure liquid chromatography and optimization techniques and mechanistic considerations. *Perkin Trans. 2*(1972–1999) (11), 1699–1703.
- Lykins, B.W., Griesse, M.H., 1986. Using chlorine dioxide for trihalomethane control. *J. Am. Water Works Assoc.* 78 (6), 88–93.
- McVeigh, J.R., Lee, R.G., Kelleher, D.L., 1985. Chlorine dioxide use in pretreatment for control of trihalomethane generation. In: *Proceedings of the AWWA Annual Conference, AWWA*, pp. 825–839.
- Myers, A.G., 1990. Evaluating alternative disinfectants for THM control in small systems. *J. Am. Water Works Assoc.* 82 (6), 77–84.
- Rav-Acha, C., 1998. Transformation of aqueous pollutants by chlorine dioxide: reactions, mechanisms and products. *Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 5, Part C, pp. 143–175.
- Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1), 1–12.
- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Hendersson, A.K., Reissman, D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329 (1–3), 99–113.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32 (11), 3245–3260.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N., 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36 (17), 3855–3863.
- White, G.C., 1998. *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants*, fourth ed.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Chlorine dioxide reaction with selected amino acids in water

Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia*

Department of Chemistry, Universidad Politécnic de Valencia, Camino de Vera S/N, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2007

Received in revised form 3 September 2008

Accepted 4 September 2008

Available online 7 September 2008

Keywords:

Chlorine dioxide

Amino acids

Reaction mechanism

ABSTRACT

Chlorine dioxide is a hypochlorite alternative disinfectant agent. In this context, we have determined the products formed in the reaction of ClO_2 with selected amino acids as model compounds that can be present in natural waters. The reaction of tryptophane, histidine and tyrosine (10 ppm each) with ClO_2 were studied at molar ratios ranging from 0.25 to 4 in the presence or absence of oxygen. It was found that in the absence of oxygen adding substoichiometric amounts of ClO_2 creates products that are structurally similar to the starting amino acids. Through a series of cascade reactions the initial product distribution gradually evolves toward simple, small carbon chain products that are far from the starting amino acid. The reaction product distribution revealed that chlorine dioxide can attack the electron-rich aromatic moieties as well as the nitrogen atom lone electron pair. Our study is relevant to gain knowledge on the reaction mechanism of ClO_2 with ubiquitous amino acids present in natural waters.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the different chemical agents that can be used as chlorine alternatives for water potabilization, chlorine dioxide is one that has attracted considerable attention [1–9]. The use of chlorine dioxide as a preoxidant instead of chlorine is known to have a beneficial influence of minimizing the trihalomethane (THM) formation following post-chlorination [6,10–17]. Although the origin of this THM reduction when using ClO_2 in pre-oxidation is believed to arise from the lack of ClO_2 tendency to produce chlorination in organic molecules [18].

Aimed at gaining some understanding on the reaction mechanism of chlorine dioxide as a water disinfection agent, herein we have carried out a product study of the reaction of chlorine dioxide with some representative amino acids in water. Among the natural constituents of surface water besides humic and fulvic acids, peptides [19,20] and glycidic from plants and microorganisms [21–25] are the main components. Therefore, the positive effect of chlorine dioxide treatment on the reduction of THM content could arise from a specific reactivity of chlorine dioxide with carbohydrates and peptides which is different from that of chlorine. Thus, while most of the studies on the action of ClO_2 have been limited to phenolic structures, some reports [26] have shown that amino acids can give rise to high THM concentrations when reacted with chlorine.

Although there are some old precedents regarding the reactivity of ClO_2 with amine compounds [27,28], it is note worthy that there

is a paucity of studies focused on the identification of the chemical structure of the products arising from reaction of organic substrates with chlorine dioxide under conditions and concentrations relevant to potable water treatment [29]. However, systematic studies of the product distribution by reaction of relevant organic compounds with chlorine dioxide could eventually lead to the understanding of the specific way of action of chlorine dioxide with respect to the THM reduction in potable water. Moreover, the actual product distribution could depend on the amount of ClO_2 (substrate to ClO_2 molar ratio) since a cascade of reactions can occur. Therefore, rather than determining the identity of the products resulting from a single ClO_2 dose level, it is more informative to follow the evolution of the product distribution as a function of the ClO_2 concentration. This novel methodology has never been applied to the understanding of ClO_2 pretreatment and can basically answer the question of whether or not the reaction of a given organic compound is catalytic or stoichiometry from the ClO_2 point of view. In addition the role of ambient oxygen on the ClO_2 reaction should be addressed to determine if there is a synergism of the ClO_2 reactivity by oxygen. This point can be simply studied by performing some control experiments in absence of oxygen under inert atmosphere.

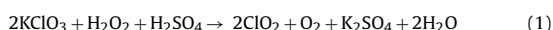
2. Experimental

2.1. Generation of chlorine dioxide

Chlorine dioxide was generated by chlorate reduction with sulphuric acid and hydrogen peroxide, according to Eq. (1) [30]. The ClO_2 generation was accomplished by stirring at 60 °C in a flask a

* Corresponding author. Tel.: +34 96 387 7807; fax.: +34 96 387 78 09.
E-mail address: hgarcia@qim.upv.es (H. Garcia).

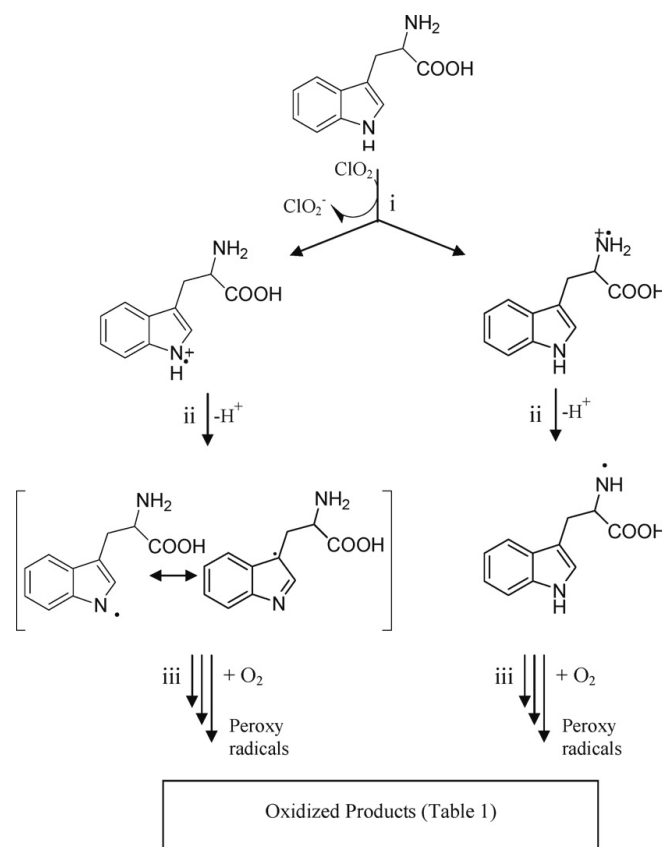
mixture of KClO_3 (5 g), H_2O_2 (4 mL, 33% in water) and concentrated H_2SO_4 (4.5 mL, 50% in water). The evolved gaseous ClO_2 was collected in water and the resulting concentrated aqueous ClO_2 solution was titrated by determining the optical absorption of the solution at 360 nm ($\epsilon_{360} = 1250 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) after buffering the solution pH at 7 (with HCO_3^- , 1 M). ClO_2 is a highly toxic and chemically unstable compound that has to be handled with extreme precaution. Fume hoods and safety gloves and glasses have always to be used. Avoid breathing of ClO_2 vapors. A chlorine dioxide stock solution of 500 ppm was used to dose amino acid solutions in the range of 1–15 ppm ClO_2 .



2.2. General reaction conditions

A previous issue that we considered important when performing the present study is to determine the experimental conditions and the substrate to ClO_2 molar ratio that could later be relevant with respect to those commonly employed in water treatment plants. Obviously all the reactions were performed in water at near ambient temperature under continuous stirring, using amino acid concentrations in the range of 10 ppm and a substrate to ClO_2 molar ratio between 10 and 0.25. In this way, the concentration of amino

acid in the synthetic water has been kept to the minimum amount that makes possible product detection while the required ClO_2 to react with this amount of amino acids is only slightly above the concentration that can be used industrially in water potabilization (1.4 ppm as maximum) [31,32]. Also the contact time has to be limited to the usual period occurring during the water treatment process that is typically of a few hours. After titration of ClO_2 at pH 7, experiments have been performed buffered at pH 7.5 with $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (10 mM) or unbuffered, in which case the pH typically decreased from pH 6 to pH 4 during the course of the reaction. Experiments were conducted in the absence of buffer in order to prevent modification or alteration of the product distribution of each amino acid by the carbonate buffer. A series of reactions were conducted in the presence of oxygen working at the open atmosphere that should permit the formation of oxygenated products. Other series of reactions were carried out using the same substrate concentration (10 ppm) but in the absence of oxygen. Oxygen free solutions were obtained by purging with an Ar stream (45 min) prior to the reaction and conducting the treatment on a sealed vessel. In these cases, the water was not concentrated by rotary evaporation but submitted immediately to lyophilization to ensure the absence of oxygen during the work up. There are some cases in which the solution was coloured and the presence or absence of ClO_2 could not be determined by optical spectroscopy. In these



Scheme 1. Proposed reaction mechanism for the attack of ClO_2 to tryptophane.

cases, the presence of ClO_2 was detected by the positive test using DPD (*N,N'*-diethyl-1,4-phenylenediamine) as indicator (ISO 7393-2:1985) [33]. For those reactions in where ClO_2 did not completely react at the final reaction time, the reaction was stopped by addition of sodium thiosulphate (50 mg) until the solution does not give positive test using DPD as indicator.

2.3. Analysis of reaction products

At the final time (24 h) the reaction mixtures were acidified to pH 2 with HCl, concentrated at 40°C and lyophilized. The residue as suspended in BSTFA + 10% TMCS and the solution stirred at 80°C for 8 h [34]. The resulting silylated mixture was dissolved in anhydrous acetonitrile, filtered through a $0.45\ \mu\text{m}$ membrane and injected in a gas chromatography GC-MS system (Hewlett Packard HP6890 Chromatograph and mass detector Agilent 5973). The capillary column (30 m) contains crosslinked (5%) phenylmethylsilicone (HP-5MS) as stationary phase. Helium was used as a carrier gas (1.2 mL/min). The injection volume was $1\ \mu\text{L}$. The injection and detector temperatures were 250 and 280°C , respectively. The oven temperature programme starts at 50°C for 3 min, then it increases at a rate of $8^\circ\text{C}/\text{min}$ up to 90°C , maintains this temperature for 2 min and subsequently rises again at a rate of $15^\circ\text{C}/\text{min}$ up to 280°C for 10 min [35,36]. Quantification of the reaction products was made by using the internal standard method consisting in the addition of a known amount of nitrobenzene to the solution to be injected. A response factor of 1 was assumed for all the products in the calibration. The absence of buffer makes the analysis of non-volatile products easier since a large quantity of BSTFA is consumed by the buffer. Complete silylation of the reaction products in the presence of buffer requires an enormously large excess of BSTFA since otherwise silylation is not achieved.

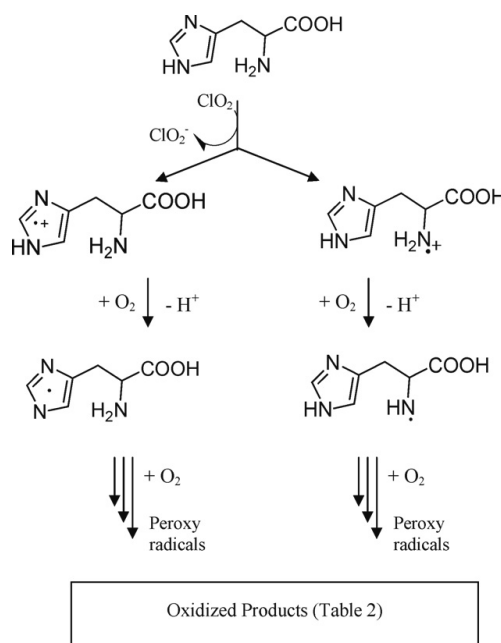
2.4. Compound identification

Product identification was based on the mass spectra of each compound. When the proposed structures were available in the mass spectra databases (NIST 98), the match between the mass spectra and the spectra from the NIST 98 database is given (see Table S5). In some other cases, when commercially available, comparison of the retention time in GC of the proposed structure with that of an authentic standard was made.

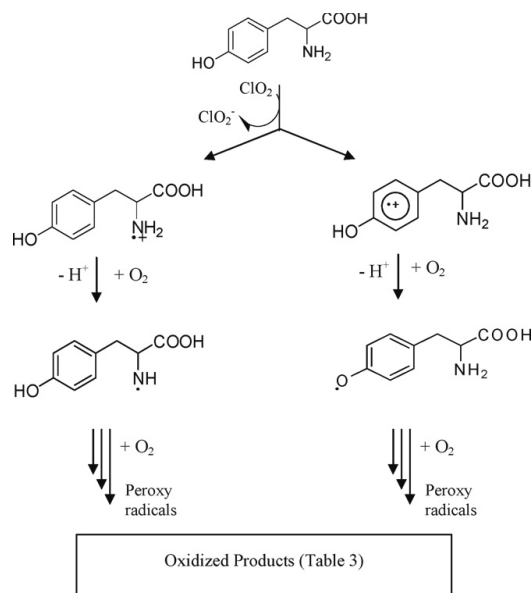
The compounds that had been characterized by comparison of the retention time and MS with authentic standards are listed in Table S1. Furthermore, compounds 5-hydroxy 2,4-imidazolidinedione and *N*-formylanthranilic acid were synthesized by alternative routes (Table S2) [37,38] to compare their retention time and mass spectra of their trimethylsilyl derivatives with the data of the reaction mixture. The identification of the other products was based solely on their mass spectra of their trimethylsilyl derivative and they are also listed in Tables S3, S4 and S5. Supplementary information (Tables S3, S4 and S5) contains the actual mass spectra for each reaction product.

3. Results and discussion

In the present work we have made a product study of the reaction of chlorine dioxide with a series of amino acids that have been earlier reported to react with ClO_2 [39–42]. It is pertinent to comment here that while some kinetic data about the ClO_2 disappearance in the presence of amino acids and peptides [43] constitutes a related precedent to our work, no efforts to disclose the structure of the reaction products was done in these precedents. Schemes 1–3 will summarize our mechanistic proposals. The lack of data related to the chemical structure of the reaction products



Scheme 2. Proposed reaction mechanism for the attack of ClO_2 to histidine.



Scheme 3. Proposed reaction mechanism for the attack of ClO_2 to tyrosine.

with ClO_2 has impeded up to now the understanding of the origin of THM reduction by treating waters with ClO_2 as disinfectant agent instead of chlorine.

3.1. Reaction of ClO_2 with tryptophane

When tryptophane was reacted with excess of ClO_2 (4:1 molar ratio of ClO_2 respect to tryptophane, 10 ppm tryptophane concentration, aerated aqueous solutions, room temperature), the reaction proceeded instantaneously as evidenced by the change in the colour from yellow (characteristic of aqueous ClO_2 solutions) to brown. Our observation agrees with earlier report [43] that measured the ClO_2 disappearance kinetics for the tryptophane/ ClO_2 reaction using a fast kinetics stopped-flow set up.

In our case, the analysis of the reaction products has allowed detection of the compounds indicated in Table 1. As can be seen there, when tryptophane is treated with an excess of ClO_2 the most abundant products were oxalic and fumaric acid, accompanied with lesser amounts of 2-aminobenzoic acid, *N*-formylanthranilic acid and 2-(2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid. These products, particularly the two or four carbon atom carboxylic acids, indicate that a cascade of consecutive degradation reactions with extensive carbon-carbon bond breaking has broken tryptophane down into low molecular mass compounds. No other products were observed.

While the previous data indicate the most robust part of the tryptophane structure (the one corresponding to the 2-aminobenzoic moiety) and also that the five-member indol ring is quite reactive and undergoes oxidative ring opening [44], the reaction products are too far from the starting tryptophane to give any indication of the initial sites where chlorine dioxide attacks or to identify some of the primary reaction intermediates with larger number of carbons.

In order to address specifically the initial attack site and also to illustrate in which extent the substrate to ClO_2 molar ratio influences the product distribution, we performed the same reac-

tion between tryptophane and ClO_2 under less ClO_2 excess in the absence of oxygen. The rationale behind this experiment was to stop the reaction cascade at early stages while preventing oxygen from intervening in the degradation pathway.

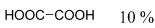
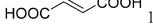
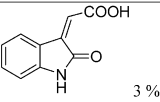
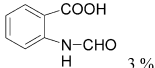
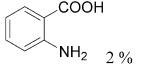
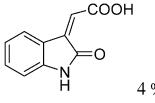
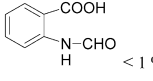
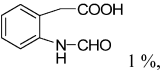
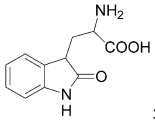
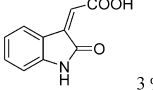
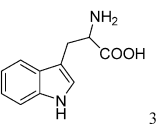
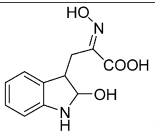
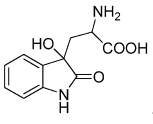
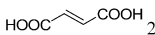
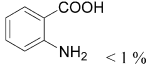
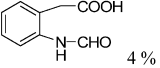
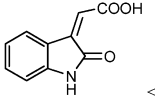
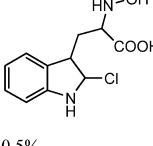
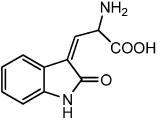
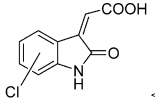
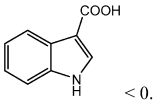
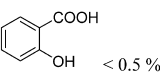
As expected, the product distribution under these conditions changes completely with respect to that previously commented for ClO_2 excess under aerobic conditions. Also in accordance with our expectations the majority of the products still contain most of the carbon skeleton intact or very similar to that of tryptophane.

Upon consideration of the product structures it can be inferred that there are two preferential competing sites at which reactions between ClO_2 and tryptophane can take place (Scheme 1). One of them is the amino acid nitrogen atom forming hydroxylamines, oximes and imines. In the chemistry of organic nitrogenated compounds oxidation to hydroxyl imines, oximes and imines is a well-known chemistry [45]. Although no evidence based on product characterization was obtained, it is very likely that further oxidation at this position will lead eventually to the loss of the lateral chain with disconnection between the indol and the α -amino acid moieties. Oxidative C-C bond breaking in the α -positions to heteroatoms is also a well-known process [45].

On the other hand, ClO_2 also attacks to the 2 and 3 positions of the indol ring producing initially hydroxylation of a ring with subsequent formation of the carbonyl group that eventually promotes ring opening. Indol chemistry has been subject of extensive studies [46].

A reasonable degradation route to account for the products observed is proposed in Scheme 1. According to this scheme that is compatible with thermodynamic data based on known redox potential of tryptophane and ClO_2 , the products formed in the early degradation events will arise from single electron transfer. Single electron donation from electron-rich organic molecules is a very general process for aromatic amines and heterocycles that can lead to degradation [47]. In this process, ClO_2 will be converted into chlorite while a highly reactive tryptophane radical cation will be formed (Scheme 1).

Table 1Product distribution observed for the reaction of ClO₂ with tryptophane, at 20 °C, under argon or oxygen atmosphere using several reagent molar ratios.

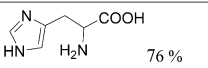
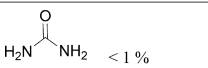
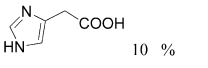
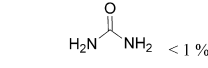
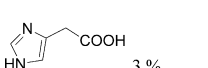
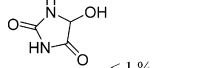
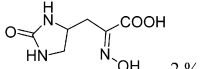
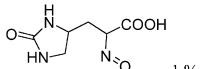
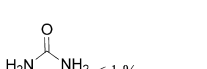
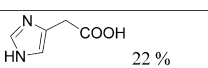
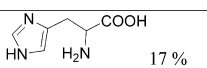
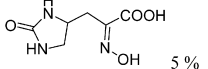
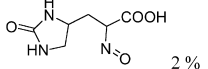
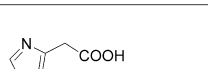
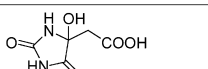
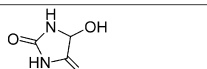
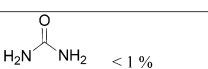
Tryptophane / ClO ₂ Molar Ratio 0.25, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
 10 %	 1 %	 3 %
 3 %	 2 %	
Tryptophane / ClO ₂ Molar Ratio 0.5, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
 4 %	 < 1 %	 1 %
Tryptophane / ClO ₂ Molar Ratio 1, under argon atmosphere, pH from 6 to 4		
 5 % Mixture of stereoisomers	 3 %	 3 %
 15 % Mixture of stereoisomers	 4 %	
Tryptophane / ClO ₂ Molar Ratio 0.5, under oxygen atmosphere, pH buffered 7.5		
 2 %	 < 1 %	 4 %
 < 0.5 %	 0.5% <	 <0.5%
 < 0.5 %	 < 0.5 %	 < 0.5 %

The product percentage has been estimated using nitrobenzene as external GC standard and is given with respect to the initial moles of tryptophane.

Cyclic voltammetry of tryptophane in aqueous solution shows an oxidation potential around +1.0 V vs NHE [48] and therefore it should be easily oxidized by ClO₂ [49] (E_{ox} = 1.27 V vs NHE). Two possible sites of tryptophane can give the electron to ClO₂ either the lone pair of amino acid nitrogen atom or from the electron-rich

five member ring heterocycle of the indol structure. After the initial electron transfer, tryptophane radical cation can evolve giving a proton and forming the corresponding radical that would couple with ClO₂. In this regard we should recall the radical nature of ClO₂. Thus, ClO₂ will attack to the tryptophane derived radical

Table 2Product distribution observed for the reaction of ClO₂ with histidine, at 20 °C, under argon or oxygen atmosphere using several reagent molar ratios.

Histidine / ClO ₂ Molar Ratio 10, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
 76 %	 < 1 %	
Histidine / ClO ₂ Molar Ratio 1, under argon atmosphere, pH from 6 to 4		
 10 %	 < 1 %	
Histidine / ClO ₂ Molar Ratio 1, under oxygen atmosphere, pH buffered 7.5		
HOOC-COOH < 1 %	 3 %	 < 1 %
 2 %	 1 %	 < 1 %
Histidine / ClO ₂ Molar Ratio 1, under argon atmosphere, pH buffered 7.5		
HOOC-COOH 1 %	 22 %	 17 %
 5 %	 2 %	
Histidine / ClO ₂ Molar Ratio 0.33, under argon atmosphere, pH from 6 to 4		
 41 %	 2 %	 1 %
 < 1 %		

The product percentage has been estimated using nitrobenzene as external GC standard and is given with respect to the initial moles of histidine.

forming a covalent bond giving rise to a chlorite ester which would hydrolyze to a tryptophane hydroxy derivative. Also at the stages of radical cation or radical, the species can react with dissolved oxygen when the reaction is carried out under aerobic conditions. Thus, ClO₂ shows as preferential attack sites either at the amino acid nitrogen or at C-2 and C-3 of the indol ring (Scheme 1). Then, in the absence of oxygen, if an excess of ClO₂ is present, these primary products will be unstable and will continue their way to further degradation by consecutive reactions with ClO₂ (see Scheme 1).

Different pathways are possible depending on the position of the second and subsequent attacks (Scheme 1). When the attack has occurred initially at the amino acid nitrogen, the reaction route probably continues with the formation of multiple carbon–nitrogen bonds and decarboxylation [2-(hydroxyimino)-3-(2-hydroxyindolin-3-yl)propanoic acid, 3-(2-chloroindolin-3-yl)-2-(hydroxyamino)propanoic acid, 2-(2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid, indole-3-carboxylic acid]. When the initial attack was at the indol ring further hydroxylation and ketone formation would occur leading eventually to the heterocyclic ring aperture [2-amino-3-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)propanoic acid, *N*-formylanthranilic acid]. According to the product distribution observed for the high substrate to ClO₂ molar ratios it seems that attack to the indol ring is more favourable giving higher product yields than attack

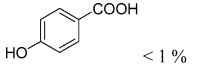
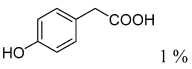
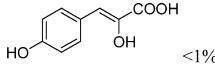
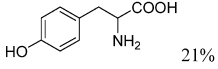
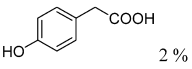
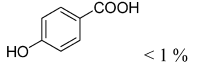
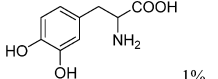
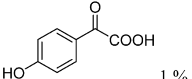
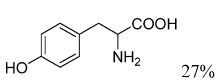
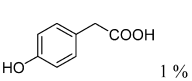
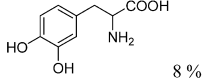
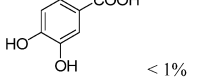
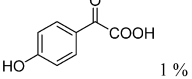
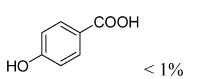
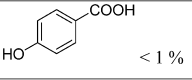
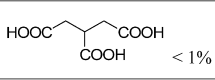
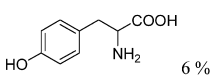
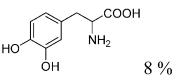
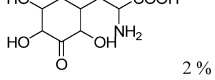
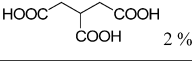
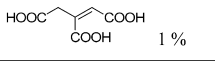
to the amino acid nitrogen [46]. The latter will proceed leading to products with a few carbon atoms.

In summary according to our data, ClO₂ initiates the attack to tryptophane by single electron abstraction and subsequent oxidative radical coupling processes. Oxygen is not needed in the initial steps but, if present in the medium, it will intervene intercepting the radicals and given oxygenated products.

3.2. Reaction of histidine with ClO₂

The previous conceptual framework to understand tryptophane degradation also applies in part for histidine degradation by ClO₂ (Scheme 2). Thus, under conditions in which there is an excess of ClO₂ with respect histidine, and working under aerobic conditions, extensive degradation steps occurs leading to one or three carbon carboxylic acids as indicated in Table 2. Histidine degradation under these conditions is not a chain reaction since when histidine/ClO₂ molar ratio is 10 most of histidine remains unaltered even in the presence of oxygen. Nevertheless, the role of oxygen promoting decomposition after the initial stoichiometric attack of ClO₂ is also manifested by the fact that treating histidine with ClO₂ under argon shows a different product distribution pattern, wherein the primary products arise from the preferential attack of ClO₂ to the amino acid nitrogen atom leading in the case of histidine to high chemical

Table 3Product distribution observed for the reaction of ClO₂ with tyrosine, at 20 °C, under argon or oxygen atmosphere using several reagent molar ratios.

Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 0.25, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
HOOC-COOH	6 %	
Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 0.4, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
	< 1 %	 1 %
		 <1%
Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 1, under oxygen atmosphere, pH from 6 to 4		
	21%	 2 %
		 < 1 %
	1%	 1 %
Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 1, under argon atmosphere, pH from 6 to 4		
	27%	 1 %
		 8 %
	< 1 %	 1 %
		 < 1 %
Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 0.5, under oxygen atmosphere, pH buffered 7.5		
HOOC-CH ₂ -COOH	4 %	 < 1 %
		 < 1 %
	6 %	 8 %
		 2 %
Tyrosine / ClO ₂ Molar Ratio 0.25, under oxygen atmosphere, pH buffered 7.5		
HOOC-COOH	10 %	 2 %
		 1 %

The product percentage has been estimated using nitrobenzene as external GC standard and is given with respect to the initial moles of tyrosine.

yields of the corresponding 4-imidazolyl acetic acid. As in the case of tryptophane, this primary compound is again not stable and, if an excess of ClO₂ is available, hydroxylated heterocyclic compounds start to appear leading eventually to the cleavage of the histidine lateral chain and the heterocyclic ring opening. Table 2 contains a summary of the products characterized as a function of the ClO₂ molar ratio and the presence or absence of oxygen.

3.3. Reaction of ClO₂ with tyrosine

The same methodology, i.e., working at different substrate to ClO₂ molar ratio either in presence or absence of oxygen, was also applied to understand the degradation of tyrosine and the resulting reaction products. The product distribution characterized upon the treatment of tyrosine with ClO₂ is shown in Table 3. As on the previous cases, stoichiometric amounts of ClO₂ in the absence of oxygen lead to products that are structurally closely related to the starting tyrosine.

Recently the ClO₂ oxidation of tyrosine in presence of oxygen using a substoichiometric amount of ClO₂ has been studied [29] and the formation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (L-DOPA) has been observed by UV spectroscopy. In contrast, in our case, excess of ClO₂ in the presence of oxygen leads to short-chain, highly functionalized carboxylic acids very far from the starting tyrosine. This again indicates that ambient oxygen is intercepting radical species leading to massive degradation of the initial structure. By combining the product distribution of this series of reactions under different conditions, a more complete understanding of the degradation pathways was obtained. Based on Table 3 a degradation route can be proposed as indicated in Scheme 3. Common with the previous examples is that the initial proposed step consists of a single electron oxidation of tyrosine, followed by a series of radical couplings and decarboxylation of the phenolic lateral chain. In this way, phenolic carboxylic acids with one or two aliphatic carbon atoms are formed. Also, hydroxylation of the aromatic ring forming hydroquinone derivatives is competitively occurring and eventually will lead to the benzene ring rupture and formation of mono and dicar-

boxylic acids. Again hydroxylation can take place by ClO₂ coupling with a carbon centered radical and hydrolysis of the corresponding chlorite ester or by the interception and trapping by oxygen of the carbon centered radicals.

4. Conclusions

In the present work we have shown that the product distribution for the reaction of a compound with an excess of ClO₂ in the presence of oxygen is not enough to obtain sufficient conclusive information about the operating degradation pathways. In fact, the product distribution changes drastically depending on whether substoichiometric or excess amounts of ClO₂ are used and also on the presence or absence of oxygen. Also we have shown that appropriate characterization of the reaction products requires the adequate derivatization of polyhydroxylic and carboxylic acids. By applying a systematic methodology, consisting of increasing the ClO₂ molar ratio and performing the reaction in the absence or presence of oxygen to the three amino acids studied, we have reached the conclusion that ClO₂ attack initiates at the amino acid nitrogen atom or at electron donor aromatic substructures. The initial primary products are unstable under the reaction conditions and continue the degradation mainly by a cascade of hydroxylation, carbonyl formation, decarboxylation and ring opening steps. Given the current and potential importance of ClO₂ treatment for water potabilization our study is relevant to gain insight into the mechanisms of THM formation potential reduction by ClO₂ as compared with conventional chlorination treatment. This type of studies can be of relevance to understand the influence of ClO₂ pretreatment on subsequent THM evolution.

Acknowledgement

Financial support by the Spanish Ministry of Education (CTQ06-06859) is gratefully acknowledged. SN thanks the Universidad Politecnica de Valencia for a fellowship (Cantera programme).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.010.

References

- [1] S. Sussman, W.J. Ward, Chlorine dioxide is an attractive water treatment alternative, *Water & Sewage Works* (1979) 120–121.
- [2] G.W. Miller, R.G. Rice, C.M. Robson, R.L. Scullin, W. Kuhn, An Assessment of Ozone and Chlorine Dioxide Technologies for Treatment of Municipal Water Supplies, Public Technol., Inc., Washington, DC, USA, 1978, 81 pp.
- [3] AWWA Research Foundation & KIWA, Use of alternative disinfectants, Chlorination By-Products: Production and Control (1986) 174–188.
- [4] E.M. Aieta, J.D. Berg, A view of chlorine dioxide in drinking water treatment, *Journal of AWWA* 78 (1986) 62–73.
- [5] L. Helin, B. Ling, Application of chlorine dioxide in water treatment, *Water Treatment Technology, China* 15 (1987) 174–178.
- [6] A.G. Myer, Evaluating alternative disinfectants for THM control in small systems, *Journal of AWWA* 82 (1990) 77–84.
- [7] G.C. White, The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants, 3rd ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, pp.150–151.
- [8] N. Narkis, A. Katz, F. Orshansky, Y. Kott, Y. Friedland, Disinfection of effluents by combinations of chlorine dioxide and chlorine, *Water Science Technology* 31 (1995) 105–114.
- [9] K.M. Sutton, R. Elefritz, J. Milligan, THM control in wastewater effluent with chlorine dioxide as a supplementary oxidant, in: Disinfection 2002, Health and Safety Achieved through Disinfection, Conference Proceedings, St. Petersburg, FL, United States, February 17–20, 2002, pp. 152–165.
- [10] J.M. Symons, O. Love, Thomas Jr., C. Keith, Comparison of practical alternative treatment schemes for reduction of trihalomethanes in drinking water, in: Ozone/Chlorine Dioxide Oxid. Prod. Org. Mater., Proc. Conf., 1978, pp. 443–455.
- [11] W. Benjamin, J.R. Lukins, H. Mark, Using chlorine dioxide for trihalomethane control, *American Water Works Association* 78 (1986) 88–93.
- [12] N.J.D. Graham, G. Reynolds, D. Buckley, Laboratory simulation of disinfection regimes for trihalomethane control, *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 3 (1989) 604–611.
- [13] R. McVeigh James, G. Lee Ramon, D.L. Kelleher, Chlorine dioxide use in pre-treatment for control of trihalomethane generation, in: Proceedings Annual Conference, American Water Works Association, 1995, pp. 825–829.
- [14] S.W. Krasner, Chlorine dioxide treatment of drinking water: oxidant demand and byproduct formation, in: 38th Western Regional Meeting of the American Chemical Society, Long Beach, CA, United States, October 15–18, 2003, p. 122 (Abstracts).
- [15] B.W. Long, R.F. Miller, A.A. Rosenblatt, Pilot study: the use of high-purity, chlorine-free chlorine dioxide to minimize trihalomethane formation, *Chemical Oxidation* 6 (1997) 126–133.
- [16] G. Gordon, B. Bubnis, Chlorine dioxide chemistry issues, in: Chlorine Dioxide: Drinking Water, Process Water and Wastewater Issues, Symposium Proceedings, 3rd, New Orleans, September 14–15, 1995, 1996, pp. 1–15.
- [17] B.W. Lykins, M.H. Griese, Using chlorine dioxide for trihalomethane control, *American Water Works Association* 78 (1986) 88–93.
- [18] J. Hoigné, H. Bader, Kinetics of reactions of chlorine dioxide (ClO₂) in water-I. Rate constants for inorganic and organic compounds, *Water Research* 28 (1994) 45–55.
- [19] C. Le Cloirec, P. Le Cloirec, M. Elmghari, J. Morvan, G. Martin, Concentration and analysis of numerous nitrogenous organic substances in natural waters, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 14 (1983) 127–145.
- [20] M.H. Briggs, The presence of free sugars, peptides, and amino acids in filtered lake waters, *Life Science* 1 (1962) 377–380.
- [21] J. Buffle, Complexation Reactions in Aquatic Systems-An Analytical Approach, Ellis Horwood Limited, England, 1990.
- [22] K.W.W. Chin-Chang Hung, Peter H. Santschi, A seasonal survey of carbohydrates and uronic acids in the Trinity River, Texas, *Organic Geochemistry* 36 (2005) 463–474.
- [23] A. Mannino, H.R. Harvey, Biochemical composition of particles and dissolved organic matter along an estuarine gradient: sources and implications for DOM reactivity, *Limnology and Oceanography* 45 (2000) 775–788.
- [24] P.A. Meyers, Reaction mechanisms in environmental organic chemistry by R.A. Larson and E.J. Weber, *Organic Geochemistry* 23 (1995) 95.
- [25] E.M. Thurman, in: M. Nijhof, D.W. Junk (Eds.) *Organic Geochemistry of Natural Waters* (1985).
- [26] B. Legube, L. Hureiki, J.P. Croué, Chlorination studies of free and combined amino acids, *Water Research* 28 (1994) 2521–2531.
- [27] M. Doré, Chimie des Oxidants et Traitement des Eaux, Technique et Documentation-Lavoisier, 1989.
- [28] H. David, A. Rosenblatt, Hull Larry, C. Donald, DeLuca, R.G. Davis George Thomas, H.K. Weglein, R. Williams, Oxidations of amines. 11. Substituent effects in chlorine dioxide oxidations, *Journal of the American Chemical Society* 89 (1967) 5.
- [29] M.J.G. Napolitano, J. Brandon, J.S. Nicoson, D.W. Margerum, Chlorine dioxide oxidations of tyrosine, *N*-acetyltyrosine, and dopa, *Chemical Research in Toxicology* 18 (2005) 501–508.
- [30] M. Burke, J. Tenney, B. Indu, M.F. Hoq, S. Carr, W.R. Ernst, Kinetics of hydrogen peroxide-chlorate reaction in the formation of chlorine dioxide, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 32 (1993) 1449–1456.
- [31] USEPA, Alternative disinfectants and oxidants guidance manual, EPA-815-R-99-014, 1999.
- [32] D.J. Gates, The Chlorine Dioxide Handbook (Water Disinfection Series), American Water Works Association, 1998.
- [33] APHA, Method 4500-ClO₂-D, Standard methods for examination of water and wastewater, 18 ed., 1992.
- [34] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: product study of the reaction of three β-lactam antibiotics with ClO₂, *Water Research* 42 (2008) 1935–1942.
- [35] W.V. Ligon, H. Grade, Techniques for postcolumn derivatization in gas chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 255–261.
- [36] D. Li, J. Park, J.R. Oh, Silyl derivatization of alkylphenols, chlorophenols, and bisphenol A for simultaneous GC/MS determination, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3089–3095.
- [37] M. Chakrabarty, K. Shampa, Y. Harigaya, Y. Konda, Neat formic acid: an excellent *N*-formylating agent for carbazoles, 3-alkylindoles, diphenylamine and moderately weak nucleophilic anilines, *Synthetic Communications* 30 (2000) 187–200.
- [38] M.T.S. Yamada, Preparation of 5-hydroxyhydantoin, European Patent Application (1991).
- [39] K. Taymaz, D.T. Williams, F.F. Benoit, Reactions of aqueous chlorine dioxide with amino acids found in water, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (1979) 456–463.
- [40] I. Noss Charles, H. Dennis William, P. Olivieri Vicent, Reactivity of chlorine dioxide with nucleic acids and proteins, *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects* 4 (1983) 1077–1086.
- [41] H.K. Tan, W.B. Wheeler, C.I. Wei, Reaction of chlorine dioxide with amino acids and peptides: kinetics and mutagenicity studies, *Mutation Research* 188 (1987) 259–266.
- [42] A.C. Sen, J. Owusu-Yaw, W.B. Wheeler, C.I. Wei, Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with tryptophan, *N*-methyltryptophan, and 3-indolelactic acid: kinetic and mutagenicity studies, *Journal of Food Science* 54 (1989) 1057–1060.

- [43] H. Tan, A.C. Sen, W.B. Wheeler, J.A. Cornell, C.I. Wei, A kinetic study of the reaction of aqueous chlorine and chlorine dioxide with amino acids, peptides and proteins, *Journal of Food Science* 52 (1987) 1706–1711.
- [44] R.J. Sundberg, The chemistry of indoles, in: A.T. Blomquist (Ed.), *Organic Chemistry, a Series of Monographs*, Academic Press, New York and London, 1970.
- [45] Jerry March, Michael B. Smith, *March's advanced organic chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure* (6th ed.) (2007).
- [46] A.R. Katrizky, *Advances in Heterocyclic Chemistry* 83. (2002).
- [47] J.K. Whitesell, M.A. Fox, *Core Organic Chemistry*, Jones and Bartlett, Boston, 1997.
- [48] A. Harriman, Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine, *Journal of Physical Chemistry* 91 (1987) 6102.
- [49] E. Metcalf, Inc., *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, McGraw-Hill, New York, 2003.

Photocatalytic water disinfection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* using a fibrous ceramic TiO₂ photocatalyst

Sergio Navalon, Mercedes Alvaro, Hermenegildo Garcia,
Daniel Escrig and Víctor Costa

ABSTRACT

Cryptosporidium parvum and *Giardia lamblia* are two of the most chlorine resistant microorganisms with notable adverse effects on humans. Our study shows that waters containing these two protozoa at low concentrations can be efficiently disinfected in continuous flow by using a commercial fibrous ceramic TiO₂ photocatalyst. The efficiency of the photocatalytic disinfection is largely enhanced by adding a small concentration of chlorine. In this way, the residence time on the photoreactor can be considerably shortened. In contrast, under the same conditions and radiance power, UV light without any photocatalyst is significantly less efficient, particularly for *G. lamblia*. These results exemplify the advantages of the photocatalytic process for safe and complete water disinfection.

Key words | *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, photocatalysis, water disinfection

Sergio Navalon
Mercedes Alvaro
Hermenegildo Garcia (corresponding author)
Instituto de Tecnología Química CSIC-UPV and
Department of Chemistry,
Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera S/N,
Valencia 46022,
Spain
E-mail: sermaol@doctor.upv.es;
malvaro@qim.upv.es;
hgarcia@qim.upv.es

Daniel Escrig
Víctor Costa
Research Centre. Ube Corporation Europe,
S.A., Polígono El Serrallo,
Grao de Castellón 12100,
Spain
E-mail: d.escrig@ube.es;
v.costa@ube.es

INTRODUCTION

Water disinfection to ensure the absence of pathogen microorganism noxious for the human health is one of the main issues in water treatment (Orme *et al.* 1990; Pontius 2002; Betancourt & Rose 2004). Among the different protozoa relevant for water disinfection tests, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* are two microorganisms of large importance since they are known to be remarkable resistant to disinfection by chlorination (Rice *et al.* 1982; Betancourt & Rose 2004). UV irradiation is a general method for water disinfection (Hijnen *et al.* 2006; Linden *et al.* 2007). However *C. parvum* and *G. lamblia* are also notoriously resistant to UV light and for these two protozoa remarkable long exposition times compared to aerobic bacteria are needed in order to have a large reduction on the microorganism count (Hijnen *et al.* 2006). With these precedents in mind and choosing *C. parvum* and *G. lamblia*

as test protozoa, in the present work we want to report the disinfection activity of a novel silica-supported TiO₂ ceramic photocatalyst.

TiO₂ is a widely used photocatalyst (Fujishima *et al.* 2000) that upon excitation generates a charge separated state consisting on electrons in the conduction band and positives holes in the valence band. According to the electrochemical values, electrons in the conduction band are mildly reducing species, but in any case able to reduce molecular dioxygen into O₂⁻ superoxide. In contrast, holes in the valence band are strongly oxidizing agents able to oxidize water to highly aggressive hydroxyl radicals. These OH radicals as well as superoxide and other active oxygen species are responsible for disinfection in water by attacking cellular membranes as well as cytoplasmatic proteins (Rincón & Pulgarin 2003, 2004).

One general problem of TiO₂ is how to design a photochemical reactor for continuous flow operation (Pozzo *et al.* 1997). Most of the reported work on photocatalytic disinfection has been performed with small volumes under batchwise conditions (Mendez-Hermida *et al.* 2005) and using suspended TiO₂ powders (Sökmen *et al.* 2007; Ryu *et al.* 2008). In this context, TiO₂ powders suspended in water are difficult to be used in continuous flow operation, supported titania photocatalyst being much more suitable for this purpose. This issue of how to present the photocatalyst is particularly important for continuous flow experiments, since immobilization of the semiconductor can lead to a decrease of the disinfection efficiency compared to the use of stirred TiO₂ powders. Therefore, the recently reported titania-containing silica fibers are promising because they can serve to prepare non-woven porous fabrics that can be permanently exposed to UV light in a photochemical reactor without leaching titania (Toshihiro *et al.* 2002). A continuous flow can go through this photocatalytic fabric, thus ensuring an optimal photocatalytic activity of the system by contacting the water with the light exposed photocatalyst. In the present work we report the disinfection efficiency of a silica-supported titania fabric (Toshihiro *et al.* 2002) for *C. parvum* and *G. lamblia* protozoa. Compared to related precedences on photocatalytic disinfection (Sökmen *et al.* 2007; Ryu *et al.* 2008) our study presents as important features the use of contaminated solutions prepared at low protozoa counts and using real water that contains significant concentrations of carbonate and bicarbonate, inorganic salts and dissolved organic matter (DOM). This situation, low protozoa count and natural freshwater with a high content in inorganic salts

and DOM makes more real the present study in comparison to the use of model solutions with purified water (Lisle & Rose 1995). We will present data showing that photocatalytic irradiations using TiO₂ ceramics is much more efficient for water disinfection than exclusive UV irradiation.

METHODS

Materials

C. parvum (10⁷ oocysts in 1 ml filtered PBS) and *G. lamblia* (10⁶ cysts in 1 ml filtered PBS) were supplied by BTF Company.

Sodium hypochlorite (10–13%) and sodium thiosulfate were of analytical grade and supplied by Sigma-Aldrich.

Supported titania photocatalysts were supplied by UBE Corporation Europe and it is commercially available (<http://www.ube.es>). Basically this photocatalyst consists in a non-woven fabric of silica-titania fibers (Toshihiro *et al.* 2002). The photocatalytic ceramic TiO₂ fibers were prepared by thermal decomposition at high temperature of 50/50 wt mixtures of polycarbosilane and titanium butoxide (Toshihiro *et al.* 2002). During the thermal treatment at 1,200°C formation of a nanocrystalline TiO₂ particles embedded into the ceramic matrix occurred while the different density makes the TiO₂ phase to migrate predominantly to the upper part of the ceramic material (see Figure 1). According to XRD diffraction applying the Scherrer's equation the average particle size of TiO₂ was 8 nm. The TiO₂ nanocrystals are predominantly anatase (Figure 1b). The composite fibre has an average diameter of 10 μm. The tensile strength of the fibre was about 2 GPa. Figure 1 shows a pictorial illustration of the structure of the

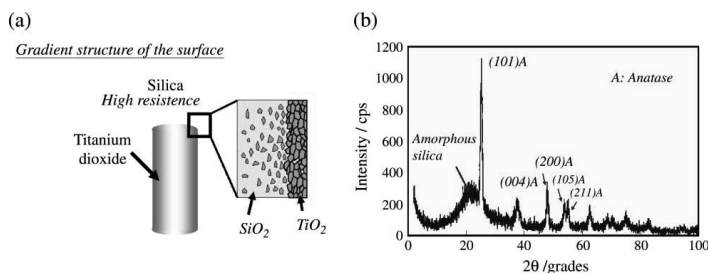


Figure 1 | (a) Cartoon showing the inhomogeneous structure of the fibrous ceramic UBE photocatalyst. (b) XRD of the titania phase in UBE photocatalyst corresponding to anatase.

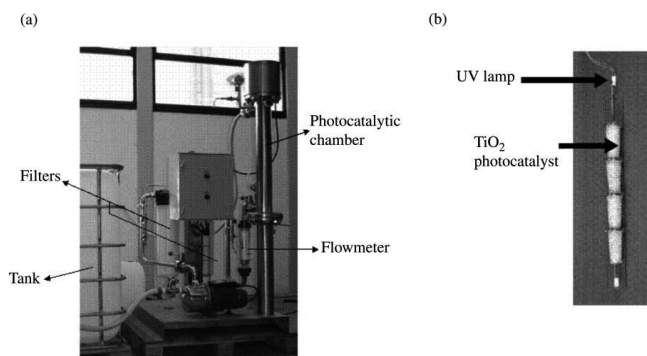


Figure 2 | (a) Photoreactor used in this work; (b) Detail of the UV lamp and photocatalyst.

fibrous ceramic photocatalyst in where the surface enriched TiO₂ nanocrystals has been indicated.

UV irradiations

150 liters of model water contaminated with *C. parvum* and *G. lamblia* were prepared from potable water by dechlorination with an excess of thiosulfate and subsequently was mixed with 1 L solutions of the protozoa. Prior to contamination the absence of chlorine was tested by the N,N'-diethyl-1,4-phenylenediamine (DPD) method (ISO 7393-2:1985). The contaminated water was contained in a reservoir (500 L) and was recirculated at 500 L/h through a homemade (see Figure 2) photoreactor consisting on a low pressure mercury UV lamp (765 mm length, 254 nm, 10 mW/cm²) of 40 W nominal power. The total fluence energy exiting the photocatalyst was 11.4 W. Although the photoreactor is designed to have two filters (20 and 5 μm, respectively) in series before reaching the photocatalyst chamber, the experiments reported here were carried out in the absence of any filter in order to avoid protozoa retention in the system. Prior to irradiation the contaminated water was circulated through the system for at least 30 min. The irradiation time was 0.63 min per cycle. The system was operated under continuous flow (500 L/h). Recirculating the contaminated water from the reservoir through the photoreactor and back into the tank. Sampling immediately prior to irradiation and at the required time were carried out by collecting 25 L from the photoreactor outlet.

Photocatalytic irradiations

The UBE photocatalyst shaped as truncated cones (I.D. 50 to 45 cm, 140 mm height) was fit inside a quartz photoreactor around the UV lamp (see Figure 2b). To cover the lamp length a set of four cones were placed coaxially inside the photoreactor. The water flows parallel to the lamp from the bottom to the top of the photoreactor. For those experiments in which hypochlorite was added, first the potable water was dechlorinated and when the small ClO⁻ concentration required was added. The ClO⁻ concentration indicated in Table 1 refers to the initial concentration that decreases during the course of the photocatalytic irradiation. The ClO⁻ concentration during the course of the photocatalytic experiments in the presence of this disinfectant agent was monitored periodically and the value was reset to the initial concentration when measurements indicated that ClO⁻ amount was below 0.9 ppm. Experiments were carried out in duplicate maintaining the initial count of protozoa as similar as possible. No significant differences in the results of the irradiations were observed in the replicates.

C. parvum and *G. lamblia* analysis

Analyses were carried out in Valencia (Spain) by GAMA-SER S.A. an independent certified laboratory. The applied protocol was based on the EPA method 1623 (US EPA 1999): *C. parvum* and *G. lamblia* in water were analyzed by

Table 1 | Results of the disinfection efficiency (in % given below the count number) for *C. parvum* and *G. lamblia* in the different experiments. The data correspond to the average of two experiments showing similar results. Photocatalytic conditions: 500L/h; Volume system = 150L; UV mercury lamp (254 nm, 40W)

	Entry	Irradiation time (min)	ClO ⁻ (ppm)	<i>C. parvum</i> (oocyst/20L)		<i>G. lamblia</i> (cysts/20L)	
				Initial	Final	Initial	Final
Photochemical UV irradiations without photocatalyst							
	1	14	0	51	40	165	165
				21.5%		0%	
	2	30	0	36	1	299	41
				97.2%		86.2%	
	3	4.5	0.15	52	51	135	135
				1.92%		0%	
Photocatalytic irradiations							
	4	10	0	19	4	114	16
				78.9%		86%	
	5	18	0	72	1	282	16
				98.6%		94.3%	
	6	30	0	29	0	225	11
				100%		95.1%	
	7	4.5	0.15	12	4	61	17
				66%		72%	
	8	8.5	0.15	21	0	77	0
				100%		100%	
Control without irradiation							
	9	30	0.15	52	52	282	282
				0%		0%	

filtration, immunomagnetic separation (IMS) and immunofluorescence assay (FA) microscopy. This method does not identify the *C. parvum* or *G. lamblia* stain, nor can it determine the viability or infectivity of detected oocysts and cysts (EPA method 1623).

The steps to estimate the *C. parvum* and *G. lamblia* concentration, described in the EPA method, are the following:

a. Filtration, elution and separation

20L of the water sample was filtered through a cartridge (Envirocheck de Pall, 1 µm) to retain the oocysts or cysts of *C. parvum* and *G. lamblia*, respectively. Materials on the filter are eluted with a buffer (containing Laurent12, Antifoam, Tris and EDTA) and the eluate is centrifuged to separate the oocysts and cysts, and the

supernatant fluid is removed. The oocysts and cysts are magnetized by attachment of magnetic beads conjugated to anti-*C. parvum* and anti-*G. lamblia* antibodies. The magnetized oocysts and cysts are separated from the extraneous materials using a magnet, and the extraneous materials are discarded. The magnetic bead complex is then detached from the oocysts and cysts by treatment at pH 5.

b. Oocyst and cyst count

The oocysts and cysts are stained on well slides with fluorescently labeled monoclonal antibodies and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (see Figure 3b and 4b). The stained samples are examined using fluorescence (fluorescein-5-isothiocyanate, FITC) (see Figure 3a and 4a) and differential interference contrast (DIC) microscopy. *C. parvum* oocyst contains four banana-shape sporozoites

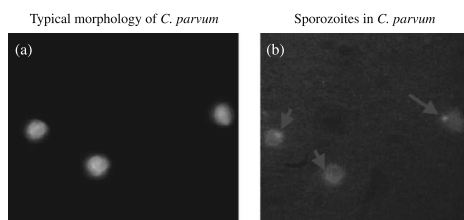


Figure 3 | *C. parvum* FITC (a) and DAPI (b) examination. The arrows show the characteristic polar regions of *C. parvum*.

therein positive count is considered when one or more sporozoites are observed by microscope (DAPI stain). *G. lamblia* has four nuclei and in this case a positive count requires the observation of at least one nucleus by microscope (DAPI stain).

RESULTS AND DISCUSSION

The preparation and characteristics of the titania containing silica fibers have been reported elsewhere (Toshihiro *et al.* 2002). Basically this photocatalyst is prepared by thermal treatment of a mixture of polycarbosilane and titanium butoxide (50% weight) at temperature of 1,200°C. Under these conditions the organic components pyrolyzed, giving rise of the formation of silica and titania phases and at this temperature titania domains migrate towards the surface of the fiber (see Figure 1) making a titania enriched functional layer of a maximum thickness of 500 nm. This exposed titania phase photocatalytically active is accessible to substrates and microorganism present in water. The most important property of these fibers is the complete absence of leaching and migration of the titania particles from the

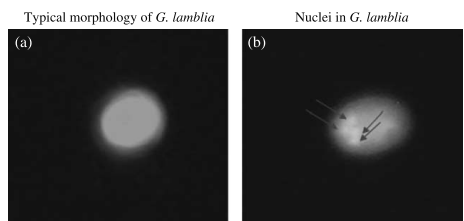


Figure 4 | *G. lamblia* FITC (a) and DAPI (b) examination. The arrows show the characteristic polar regions of *G. lamblia*.

solid to the solution. The absence of leaching is very important to ensure the stability and durability of the photocatalyst under continuous flow. These fibers, approximately of 7 μm diameter can be compressed to form porous mats that allow mass transfer from one side to the other of the photocatalyst fabric.

The mechanical resistance and the hardness on this fabric allows the design of a cylindrical photoreactor in which a 254 nm low pressure mercury lamp located at the cylinder axis illuminates the internal face of the TiO₂ containing fiber. The water flows from the central part of the cylindrical photoreactor to the external part of the cylinder crossing the illuminated photocatalyst. Figure 2 shows a schematic of the system used. The experiments were conducted at a flow of 500 L/h under atmospheric pressure giving a residence time in the photoreactor of 0.63 min per cycle. The system allows recirculation of the water through the photoreactor. For the experiments, potable water from the public network free from *C. parvum* and *G. lamblia* was dechlorinated and then purposely contaminated simultaneously with these protozoa. It is very common in real waters (Bukhari *et al.* 1997; Hancock *et al.* 1998) to have simultaneously more than one microorganism of which one could be more sensitive to disinfection than others. For the present study and in order to mimic more closely real conditions we added to the water the two protozoa. Photocatalytic disinfection tests combine simultaneously counts for oocysts and cysts of *C. parvum* and *G. lamblia*, respectively. This procedure was found the most convenient because the population of *C. parvum* and *G. lamblia* can be determined simultaneously (EPA method 1623) by counting the oocysts/cysts of these two protozoa by epifluorescence in a microscope (Figure 3 and 4). Contamination was accomplished by mixing standard commercial vials of the corresponding protozoa into the tank. The initial protozoa population was determined by taking a sample before switching the photoreactor on.

The resulting water contaminated with *C. parvum* and *G. lamblia* was stirred and recirculated for a sufficiently long time to ensure good dispersion of protozoa in the system. With this type of contaminated samples we performed four series of disinfection test using: 1) exclusively UV light (low pressure mercury lamp, 254 nm); 2) UV light (same source as before) and UBE photocatalyst, 3) UV

light and low concentration of hypochlorite and 4) UV light (254 nm), UBE photocatalyst and a low concentration of hypochlorite. The reasons to perform this series of experiments were because, on one hand, we wanted to have a blank control in the absence of any photocatalyst to determine the percentage of UV light disinfection that will be overimposed on the photocatalytic effect. On the other hand, we also wanted to establish whether the presence of a small concentration of chlorine typically present in water enhances the efficiency of the photocatalytic process. An additional reason why it is of interest to perform the photocatalytic study in the presence of chemical disinfection agents is because most legal regulations oblige water to contain a minimum concentration of any of these disinfection agents, preferably chlorine. We have also made a control in the dark when the disinfection agent is present.

The results obtained in the photocatalytic study of the samples contaminated by *C. parvum* and *G. lamblia* are summarized in Table 1.

From the results presented in Table 1, it can be seen that UV irradiation in the absence of photocatalyst is very inefficient to promote at short irradiation times a measurable percentage of reduction in the number of counts. Our results are in line with well established literature data that shows the low efficiency of UV light to effect the disinfection of *C. parvum* and *G. lamblia* (Morita et al. 2002). As a matter of fact, we selected these two protozoa for the present study because we wanted to demonstrate the activity of UBE photocatalyst for disinfection of the most reluctant microorganisms. Only when the irradiation time was sufficiently long (entry 2 in Table 1), a significant decrease in the population of the two protozoa was observed. Even at these long irradiation times, *G. lamblia* was still remarkably resistant and about 14% of the initial population survives to this treatment. Considering that increasing the UV light exposure time to longer than 30 min will not make viable the photochemical disinfection method, no further experiments were pursued.

In contrast to the low activity of UV light to effect disinfection, Table 1 shows that the photochemical process implemented with UBE photocatalyst becomes considerably more efficient. As it could be easily anticipated, the percentage reduction of the number of counts increases gradually along the time of exposure. Thus, the percentage

of population reduction using UV light combined with UBE photocatalyst is already high at 10 min exposure, becoming almost complete at 18 min (Table 1 entry 5). Particularly notable is the efficiency with respect to *G. lamblia* that appears to be the most resistant microorganism to the UV light. As commented previously for the UV irradiations illumination times longer than 30 min were not considered based on its lack of industrial viability.

Thinking in real applications of the photocatalytic system and considering that the water to be treated should contain some hypochlorite due to the current legal regulations (EU. 1998, it was of interest to test the biocide activity of the photochemical reactor implemented with the fibrous ceramic photocatalyst for contaminated water containing a small percentage of hypochlorite. The idea was to determine the influence that the presence of chlorine, even in small concentrations, plays promoting the photocatalytic disinfection.

As it can be seen in Table 1, we have found a positive synergism between hypochlorite and photocatalysis. Thus, even at very short exposure times (entry 7 in Table 1), the population reduction was significant and it was complete for less than 9 min of irradiation (entry 8 in Table 1). These results compare very favourably with the situation in which hypochlorite was absent. In this regard, a few comments should be made. First, the two protozoa under study are known to be highly resistant to disinfection by chlorine alone (Betancourt & Rose 2004) and no biocide activity occurs at the low hypochlorite concentrations tested as it was proved by a blank control (see Table 1, entry 9). The second comment is that, a blank control in which UV light was employed for disinfection of a solution containing 0.15 ppm hypochlorite was notable inefficient to effect population reduction of the two protozoa. These results point out again the role played by the titania photocatalyst in the disinfection. The third comment refers to the practicality of the system under the conditions employed in Table 1, entries 7 and 8. In fact, typically high hypochlorite concentration, in the 10 ppm range, is used for waters suspicious to contain *C. parvum* and *G. lamblia*. This high hypochlorite concentration causes adverse effects and nuisance in humans in contact with these waters containing high hypochlorite concentrations. One example of this is swimming pool waters (Hamence 1980; Scotte 1984)

in which over-chlorination is a common practice to minimize sanitary problems. In these cases, the use of the photocatalytic system described here will be highly valuable because it could allow using very low chlorine concentrations while ensuring the absence of bacteria and other noxious microorganisms.

CONCLUSIONS

In summary, the present results show that a UV photo-reactor implemented with a fibrous ceramic TiO₂ is highly efficient to promote the continuous flow water disinfection of resistant germs as *C. parvum* and *G. lamblia*. The action of this photocatalytic system is remarkably enhanced by the presence of hypochlorite in a very low concentration. This system has practical use for public recreational aquatic resorts having high biological contamination risk.

ACKNOWLEDGEMENTS

Generous financial support to UBE Corporation Europe is gratefully acknowledged. SN thanks to the Universidad Politécnic de Valencia for a postgraduate research contract (Programa Cantera).

REFERENCES

- Betancourt, W. Q. & Rose, J. B. 2004 Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* **126**(1-2), 219–234.
- Bukhari, Z., Smith, H. V., Sykes, N., Humphreys, S. W., Paton, C. A., Girdwood, R. W. A. & Fricker, C. R. 1997 Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England. *Water Sci. Technol.* **35**(11–12), 385–390.
- EU 1998 Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 relating to the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities No. L 330, 05.12.1998, pp. 32–54.
- Fujishima, A., Rao, T. N. & Tryk, D. A. 2000 Titanium dioxide photocatalysis. *Photobiol. C Photochem. Rev.* **1**, 1–21.
- Hamence, J. H. 1980 The chlorination of swimming pools and the presence of apparent nitrogen trichloride. *J. Assoc. Public Analysts* **18**, 125–128.
- Hancock, C. M., Rose, J. B. & Callahan, M. 1998 *Crypto* and *Giardia* in U.S. groundwater. *J. Am. Water Works Ass.* **58**, 58–61.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. 2006 Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* **40**(1), 3–22.
- Linden, K. G., Thurston, J., Schaefer, R. & Malley, J. P. 2007 Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7571–7574.
- Lisle, J. & Rose, J. 1995 *Cryptosporidium* contamination of water in the USA and UK: a mini-review. *J. Water SRT–Aqua* **44**, 103–117.
- Mendez-Hermida, F., Castro-Hermida, J. A., Ares-Mazas, E., Kehoe, S. C. & McGuigan, K. G. 2005 Effect of batch-process solar disinfection on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1653–1654.
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N. & Fujiwara, M. 2002 Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5387–5393.
- Orme, J., Mullin, C. S. & Ohanian, E. V. 1990 Health effects of disinfectants and disinfection by-products: a regulatory perspective. *Water Chlorination* **6**, 75–86.
- Pontius, F. W. 2002 Regulatory compliance planning to ensure water supply safety. *J. Am. Water Works Ass.* **94**, 52–64.
- Pozzo, R. L., Baltanas, M. A. & Cassano, A. E. 1997 Supported titanium dioxide as photocatalyst in water decontamination. *Catal Today* **39**, 219–231.
- Rice, E. W., Hoff, J. C. & Schaefer, F. W. 1982 Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 250–251.
- Rincón, A. G. & Pulgarin, C. 2003 Photocatalytic inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Appl. Catal B: Environ.* **44**, 263–284.
- Rincón, A. G. & Pulgarin, C. 2004 Effect of pH, inorganic ions, organic matter and H₂O₂ on *E. coli* K12 photocatalytic inactivation by TiO₂ implications in solar water disinfection. *Appl. Catal. B: Environ.* **51**, 283–302.
- Ryu, H., Daniel, G., John, C., Crittenden, & Abbaszadegan, M. 2008 Photocatalytic inactivation of *Cryptosporidium parvum* with TiO₂ and low-pressure ultraviolet irradiation. *Water Res.* **42**(6-7), 1523–1530.
- Scotte, P. 1984 Study of halogenated organic compounds in covered swimming pools. *Eau, l'Industrie, les Nuisances* **86**, 37–41.
- Sökmen, M., Degerli, S. & Aslan, A. 2007 Photocatalytic disinfection of *Giardia intestinalis* and *Acanthamoeba castellanii* cysts in water. *Exp. Parasitol.* **119**, 44–48.
- Toshihiro, I., Hiroyuki, Y., Yoshikatsu, H., Fujii, T. & Nagasawa, T. 2002 A general process for in situ formation of functional surface layers on ceramics. *Nature* **416**, 64–66.
- US EPA 1999 US EPA Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/FA. EPA-821-R-99-006.