



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Reutilización de las aguas en el sector
agroalimentario:
riesgos químicos de la desinfección

Dña. Sofía Albolafio Deltell

2022

La autora de la presente memoria ha disfrutado de un contrato predoctoral de “Formación de Personal Investigador” (FPI) (BES-2017-079969) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2016-75878-R “Sistema integral para el control de la desinfección de alimentos vegetales: riesgos microbiológicos y químicos”. Investigador principal: M.I. Gil. Co-Investigador principal: A. Allende. 30 de diciembre de 2016 – 29 de diciembre 2019.
- Programa de la Unión Europea Erasmus+ Suit4food (2017-1-MT01-KA203-026962).

Asimismo, se agradece la colaboración del Departamento de Agricultura y Alimentos (Research Institutes of Sweden, RISE) de Gotemburgo (Suecia), especialmente del investigador Epameinondas Xanthakis, con quien la doctoranda realizó una estancia durante su contrato predoctoral, así como la colaboración en la elaboración de una publicación científica.

Además, se agradece la colaboración de las empresas:

- Palintest (Contrato de apoyo tecnológico para el estudio “Análisis cuantitativo de ácido peracético en el agua de lavado de manzanas”).
- Citrosol (Contrato de transferencia de tecnología para el desarrollo del proyecto titulado: “Citrosol Vertido Cero® (y Sistemas Citrocide®).
- Acciona Agua, S.A.U. (Contrato de apoyo tecnológico para el estudio “Evaluación de la eficacia de los tratamientos terciarios implantados en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) de la Región de Murcia para el cumplimiento de la nueva regulación europea (15254/19)).

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes trabajos:

- Marín, A., Tudela, J.A., Garrido, Y., **Albolafio, S.**, Hernández, N., Andújar, S., Allende, A., Gil, M.I. (2020). Chlorinated wash water and pH regulators affect chlorine gas emission and disinfection by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 1466-8564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102533>.
- **Albolafio S.**, Gil, M.I., Allende, A., Xanthakis, E. (2021). Potential of Wastewater Valorization after Wet Extraction of Proteins from Faba Bean and Pea Flours. *Recent Progress in Materials*, 3 (2). <https://doi.org/10.21926/rpm.2102013>.
- **Albolafio, S.**, Tudela, J.A., Hernández, N., Ortuño, J.A., Allende, A., Gil, M.I. (2021). Practical applications of sensor-based methodologies for monitoring peracetic acid (PAA) as a disinfectant of fresh produce wash water. *Food Control*, 121, 107632. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107632>.
- **Albolafio, S.**, Tudela, J.A., Hernández, N., Sosa, B.P., Allende, A. Gil, M.I. (2021). Monitoring and control of wash water sanitation. *Acta Horticulturae*, 1319, 75-80. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1319.9>.
- **Albolafio, S.**, Marín, A., Allende, A., García, F., Simón-Andreu, P.J., Abellán-Soler, M., Gil, M.I. (2022). Strategies for mitigating chlorinated disinfection byproducts in wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 288 (2), 132583. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132583>.
- **Albolafio, S.**, Marín, A., Gil, M.I. Validation and verification analyses of haloacetic acids as chlorinated disinfection by-products in the fresh-cut industry by liquid chromatography-tandem multiple reaction monitoring mass spectrometry (UHPLC-MRM). *Food Chemistry*. En revisión.

*A mis padres,
quienes siempre han confiado en mí
y han hecho lo posible para que consiguiera mis propósitos.*

A David,

quien ha dado conmigo cada paso de este largo camino.

*Mi fuerza impulsora, genuina y elocuente,
que reviste de sencillez lo que parece inalcanzable.*

*A Marc, June, David y Aitana,
la alegría que acompaña mis días.*

Durante estos cuatro años, no sólo he tenido la oportunidad de ampliar mi formación académica y de dar mis primeros pasos en la ciencia llevando a cabo un proyecto de investigación, sino que he sido capaz de crecer personalmente, enfrentarme a infinidad de retos, que poco a poco he conseguido superar, e incluso de viajar, de conocer distintos lugares y personas que me han aportado mucho, tanto profesional como personalmente. Echando la vista atrás, y aunque ha sido un camino muy duro de recorrer, siento que todo lo vivido, alcanzado y superado me ha enriquecido, y me gustaría dar las gracias a todos los que de alguna manera me han ayudado y han formado parte de esta aventura.

A mis directoras María Isabel Gil y Ana Allende, por darme la oportunidad de iniciar este proyecto científico en el principal organismo de investigación de este país. Pero sobre todo gracias a ambas por ser guía y la orientación necesaria en cada paso de este camino. Gracias Mabel por, a pesar de las dificultades que hemos tenido en estos cuatro años, estar siempre dispuesta a hacer lo posible para que esto saliera adelante, y por aportar la paciencia y la constancia en el trabajo diario para que lo hiciera.

Todo el trabajo realizado no habría sido posible sin el apoyo, respaldo y la colaboración conjunta del Grupo de Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas (CEBAS-CSIC). Gracias a todos los que en algún momento me habéis echado una mano, ya sea con alguna duda o pregunta, búsqueda de material y por acompañarme durante este tiempo (Silvia, Macarena, Pilar...).

Especialmente, me gustaría dar las gracias a Yolanda, por ser amiga y guía espiritual y laboral desde el primer momento. Tus sabios consejos y tu cariño infinito me han dado la fuerza necesaria para superar muchos baches de este camino.

A Alicia, sin la que este trabajo no hubiera salido adelante. Gracias por las innumerables horas que nos hemos pasado juntas planificando experimentos, en el laboratorio o con los resultados, y por tu actitud positiva para superar todos y cada uno de los problemas que hemos encontrado.

A Nathalie, con la que hice mis primeras andaduras predoctorales en el laboratorio. Gracias por tu profesionalidad, por tu perfecta organización y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A Juan Antonio, por tener siempre la puerta abierta para resolver mis dudas.

Por último, me gustaría dar las gracias a Marisa, Fran y Férrez, por hacer piña en el despacho y por haber sido confidentes y compañeros de buenos momentos, y a Ginés, por todas nuestras charlas trabajando en el laboratorio.

Durante mi andadura predoctoral ha habido otras personas que me han prestado su ayuda desinteresada y han contribuido a que este camino fuera un poco más sencillo.

Gracias a Rocío, siempre dispuesta a resolver todas mis dudas cromatográficas, con alegría y una gran sonrisa. Gracias por tu cariño, por aconsejarme y por aportarme las herramientas, el conocimiento y la solución de muchos problemas.

Gracias a mis compañeros de batalla y de salseo. A Lola, Carlos y Ángela, por ser amigos y gran respaldo en lo laboral y personal. A Carlos Eduardo, por compartir conmigo esas charlas sobre vivencias predoctorales. A Ángel pelirrojo, Franck y Adrián, por contribuir con los demás a las risas y al buen rollo. Gracias amigos, porque a vuestro lado he podido desconectar, divertirme y recargar pilas.

Por último, me gustaría dar las gracias al resto de compañeros del Departamento y del CEBAS con los que he coincidido durante esta etapa, algunos de los cuales me han prestado su ayuda durante este período y otros, simplemente, por preocuparse de cómo iban mis andanzas (Fernando, Pachi, Sonia, Victoria, Antonio, Juan, Diego...). A José Enrique, mi primer mentor cromatografista.

Dejo para el final a todas aquellas personas que me acompañan en mi vida personal, porque con ellos esta etapa ha sido más sencilla.

A mi familia porque, a pesar de la distancia, sé que siempre está conmigo. A mi madre, porque es el eje de mi vida y porque con sus charlas siempre ha conseguido animarme, y a mi padre, porque sé que está orgulloso de mí y porque me ha animado a que trabajara duro. Gracias por vuestra confianza y por intentar poner los medios para que alcanzara mis objetivos. A mis sobrinos, June y Marc, que me han dado la alegría y felicidad necesaria al final de esta etapa, y a mi hermano y mi cuñada, David y Aitana, porque sé que siempre me respaldan, están y estarán aquí para lo que necesite. A Paca, que ha sido mi segunda madre durante este tiempo, y se ha preocupado de hacerme buenos guisos murcianos para darme fuerza en cada día de trabajo.

A mis amigos, con los que he compartido mis dudas, experiencias y que me han acompañado durante este camino: mis ilicitanos (Carmen, mi compañera desde que éramos niñas, Teresa, Alberto, Jona, Carlos, Luis...), mis Damas de Villalcudia, que pese a la distancia están presentes (Silvia, mi querida amarilla, Idoia, Arcenegui, Bas), a mi querida Andrea, mi buen amigo Perona que me acompaña siempre, Mati y Coral, con las que inicié mi etapa metabólica. Arantxa y Lucía, que, aparte de ser amigas de siempre y para siempre, lo han dado todo con el diseño gráfico.

Mis últimas palabras van dedicadas a Ti, David. Quien realmente ha estado conmigo en cada pequeño paso de este camino. Quien ha celebrado cada alegría y superado cada bache a mi lado. Quien me aporta un punto de vista diferente, me motiva en el conocimiento y me anima a replanteármelo todo. Quien ha puesto todos sus medios que para que esto pareciera fácil. Dentro y fuera del trabajo, en lo personal y en lo profesional. Sólo quien te conoce de verdad sabe lo que estás dispuesto a dar, y yo tengo el privilegio de hacerlo. Gracias, porque si tú estás cerca “cruzar el Rubicón” parece sencillo.

Y gracias también a nuestra gran familia felina, que me han acompañado en todas y cada una de las interminables horas que he pasado en el ordenador, dándome cariño, amor y compañía.

A los que están y a los que siempre estarán: Ulises, Lía, Kuro, Mora y Eli.



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Centro de Edafología y Biología Aplicada
del Segura (CEBAS-CSIC)**

**Departamento de Ciencia y Tecnología de
Alimentos**



Universidad de Murcia

**Reutilización de las aguas en el sector
agroalimentario:
riesgos químicos de la desinfección**

Memoria realizada para obtener el Título de Doctora por
la Universidad de Murcia

Sofía Albolafio Deltell

2022

Dirigida por:

María Isabel Gil Muñoz y Ana Allende Prieto

ÍNDICE

Resumen	i
Abstract	v
Listado de abreviaturas y símbolos	ix
Listado de figuras y tablas	xxiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. RESERVAS Y GESTIÓN DE AGUA DULCE	3
2. EL AGUA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	8
2.1. Calidad de las aguas utilizadas en la industria alimentaria	10
2.2. Consumo, vertidos y características de las aguas residuales	11
2.3. Manejo sostenible de los recursos hídricos en la industria alimentaria.....	15
3. LA INDUSTRIA HORTOFRUTÍCOLA	16
3.1. Consumo, vertidos y problemática ambiental	16
3.2. Procesado y gestión del agua en la industria hortofrutícola	18
3.3. Características de las aguas residuales de la industria hortofrutícola.....	21
3.4. Calidad y seguridad de las aguas de proceso.....	23
3.5. Tecnologías de desinfección para las aguas del sector hortofrutícola.....	26
3.5.1. El cloro y los compuestos clorados	29
3.5.2. Ácido peracético (PAA)	36
3.5.3. Radiación ultravioleta (UV)	38
3.5.4. Procesos de oxidación avanzada.....	39
3.5.5. Parámetros de control de la desinfección	43

3.6. Reciclado del agua de proceso	52
4. REUTILIZACIÓN DE LAS AGUAS EN LA INDUSTRIA DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNA VEGETAL.....	55
4.1. El haba (<i>Vicia faba</i>) y el guisante (<i>Pisum sativum</i>) como fuente de proteína vegetal.....	56
4.2. Procesado y extracción de la proteína vegetal.....	58
4.3. Consumo y características de las aguas provenientes de la extracción de proteína vegetal	60
5. UTILIZACIÓN DE AGUAS REGENERADAS EN AGRICULTURA	62
5.1. Etapas de tratamiento de las aguas residuales en una EDAR.....	64
5.1.1 Pretratamiento.....	65
5.1.2. Tratamiento primario.....	66
5.1.3. Tratamiento secundario o biológico	66
5.1.4. Tratamiento terciario	68
5.2. Regulación de las aguas regeneradas para su uso en agricultura	71
6. SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN (DBPs)	72
6.1. Formación de los DBPs y su relación con los desinfectantes.....	75
6.2. Parámetros que influyen en la formación de los DBPs	81
6.3. Trihalometanos (THMs).....	86
6.4. Ácidos haloacéticos (HAAs)	87
6.5. Clorato (ClO_3^-).....	88

6.6. Efecto en la salud de los DBPs.....	89
6.7. Regulación de los DBPs: THMs, HAAs y clorato	93
6.8. Presencia de DBPs en la industria agroalimentaria	96
6.9. Metodologías de análisis para los DBPs: THMs, HAAs y clorato.....	99
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	107
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	113
1. PATRONES Y REACTIVOS	115
2. GENERACIÓN DEL AGUA DE LAVADO.....	117
3. DESINFECCIÓN DEL AGUA DE LAVADO.....	118
4. MUESTREOS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARs).....	121
4.1. Inactivación microbiológica de las muestras de agua	122
5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE HARINA DE HABA Y GUISANTE Y OBTENCIÓN DE LAS AGUAS DE PROCESO	123
6. CARACTERIZACIÓN DE LAS AGUAS.....	126
6.1. Análisis físico-químico y microbiológico	126
6.2. Análisis de compuestos de valor añadido.....	127
7. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DESINFECTANTES EN EL AGUA DE LAVADO	130
7.1 Métodos para el análisis del PAA	130
7.2 Métodos para el análisis del cloro	136

8. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES DE CLORO LIBRE (HOCl/CIO ⁻).....	143
9. MEDICIÓN DE CLORO GAS (Cl ₂)	144
10. ANÁLISIS DE SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN (DBPs).....	145
10.1. Trihalometanos (THMs).....	145
10.2. Ácidos haloacéticos (HAAs)	147
10.2.1. Preparación de soluciones patrón y matrices para la validación.....	148
10.2.2. Análisis por UHPLC-MRM	150
10.2.3. Validación de la metodología.....	152
10.2.3.1. Selectividad y especificidad	153
10.2.3.2. Curvas de calibración y linealidad	153
10.2.3.3. Límite de cuantificación (LoQ) y límite de detección (LoD)	154
10.2.3.4. Evaluación del efecto matriz	155
10.2.3.5. Veracidad.....	156
10.2.3.6. Precisión	157
10.2.3.7. Estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado	157
10.2.3.8. Incertidumbre.....	158
10.2.3.9. Verificación de la metodología en muestras comerciales	159

10.3. Clorato	160
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	160
CAPÍTULO IV: Estudio comparativo de diferentes sensores comerciales y métodos analíticos de medida para la dosificación de los desinfectantes ácido peracético y cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl) empleados en la etapa de lavado	163
1. OBJETIVO	165
2. RESULTADOS	167
3. DISCUSIÓN.....	183
CAPÍTULO V: Optimización y validación de una metodología adecuada para la detección y cuantificación de subproductos de desinfección, ácidos haloacéticos, en producto vegetal fresco cortado y en su agua de lavado	197
1. OBJETIVO	199
2. RESULTADOS	200
3. DISCUSIÓN.....	227
CAPÍTULO VI: Influencia de los reguladores de pH empleados en la desinfección con cloro en la generación de cloro gas y en la formación de los subproductos de desinfección: cambios en las características físico-químicas y microbiológicas del agua de lavado.....	237
1. OBJETIVO	239
2. RESULTADOS	240
3. DISCUSIÓN.....	254

CAPÍTULO VII: Estudio de la influencia de los tratamientos terciarios de desinfección con cloro, ácido peracético (PAA), UV, cloro/UV y PAA/UV en la formación de subproductos de desinfección (trihalometanos, ácidos haloacéticos y clorato) en aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas residuales y destinadas al riego agrícola	265
1. OBJETIVO	267
2. RESULTADOS	268
3. DISCUSIÓN.....	309
CAPÍTULO VIII: Estudio de la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la obtención de proteína vegetal y de su tratamiento con el fin de revalorizar su aprovechamiento y de reducir el impacto del vertido al medio ambiente.....	321
1. OBJETIVO	323
2. RESULTADOS	324
3. DISCUSIÓN.....	342
CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES	353
REFERENCIAS	365

RESUMEN

El agua representa un recurso esencial para la industria agroalimentaria, desde su consumo para el riego agrícola hasta los grandes volúmenes que se emplean durante el procesado de alimentos. Su elevado consumo y la generación de aguas residuales, constituyen dos de los principales problemas del sector agroalimentario. Por este motivo, se hace necesaria la optimización de los recursos hídricos, intentando siempre minimizar cualquier riesgo microbiológico o químico vinculado a la reutilización de estas aguas, principalmente los asociados a los subproductos de desinfección (DBPs). El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en el estudio de prácticas relacionadas, directa o indirectamente, con la reutilización de las aguas en distintos sectores de la industria agroalimentaria. En el sector hortofrutícola, se estudió la optimización del proceso de desinfección en la etapa de lavado para su reutilización, minimizando la contaminación cruzada y reduciendo el riesgo químico de formación y acumulación de DBPs en el agua de lavado y su absorción por el producto. Simulando condiciones industriales, se compararon sensores y métodos analíticos para establecer aquellos más adecuados para el control de la dosificación de los desinfectantes ácido peracético (PAA) y cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl), empleados en el lavado. Igualmente, para el control de la desinfección con NaOCl, se determinó la influencia de cuatro reguladores de pH (ácido cítrico, fosfórico, sulfúrico y carbónico) en la generación de los principales DBPs (trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) y clorato). Se ha estudiado el impacto de estos reguladores en las características físico-químicas y microbiológicas del agua en la gestión del cloro, su influencia en la generación de cloro gas, y el rango de pH para maximizar su capacidad antimicrobiana. Previamente, para la determinación de HAAs en agua de lavado y producto vegetal, se validó una metodología mediante UHPLC-MRM, atendiendo a los criterios de la Guía SANTE/2019/12682. También se monitorizaron los DBPs en aguas regeneradas provenientes de Estaciones Depuradoras

de Aguas Residuales (EDARs) y destinadas al riego agrícola. Se muestrearon 15 EDARs durante 6 meses para seleccionar aquellas tecnologías de desinfección capaces de prevenir la formación y acumulación de DBPs, para la reutilización estas aguas bajo condiciones seguras. Asimismo, considerando el gran consumo y generación de aguas residuales durante el proceso industrial de aislamiento de proteínas vegetales, se caracterizó y determinó la presencia de subproductos de valor añadido (proteínas, azúcares y polifenoles) en las aguas residuales tras la obtención de proteínas de harina de haba y guisante.

Los principales resultados del control de la desinfección del agua de lavado mostraron que el sensor cronoamperométrico fue el más selectivo para la determinación de PAA y cloro en el agua y sin interferencias con materia orgánica o agentes oxidantes. Asimismo, de entre todos los reguladores de pH, el ácido fosfórico resultó el más adecuado por su amplio rango de pH para alcanzar la máxima capacidad antimicrobiana, su naturaleza inorgánica, reduciendo la formación de THMs, y su carácter débil, resultando menos corrosivo. Por primera vez, se estableció la relación del ácido cítrico con la formación de cloro gas en la industria de procesado. En cuanto al estudio de las aguas regeneradas provenientes de EDARs, se demostraron los beneficios del PAA, UV o PAA/UV como alternativa al cloro y cloro/UV, reduciendo el riesgo químico en el producto vegetal regado. Por último, todas las aguas residuales de la extracción proteica mostraron alto contenido en materia orgánica, revelando impacto medioambiental en caso de vertido y siendo necesario su tratamiento, proponiendo tecnologías de membrana para la retención de compuestos solubles. Estas aguas fueron óptimas para su potencial revalorización, mostrando las primeras fracciones derivadas de la extracción proteica de haba el mayor contenido de polifenoles.

ABSTRACT

Water represents an essential resource for the agri-food industry, from its consumption for agricultural irrigation to the large volumes of water used during food processing. The high water consumption and the consequent wastewater generation are two of the main problems in the agri-food industry. For this reason, it is necessary to optimize water resources while minimizing problems associated with its reuse, such as microbiological and chemical risks, particularly chemical residues such as the disinfection by-products (DBPs). The main objective of this Thesis has been the study of practices related to both directly and indirectly water management and reuse practices in different sectors of the agri-food industry. In fresh produce, the optimization of the disinfection treatments used to maintain the microbiological quality of the process water during washing for water reuse was studied, reducing cross-contamination and chemical risk of formation and accumulation of DBPs in the water as well as their absorption by the product. By mimicking industrial conditions, sensors and analytical methodologies were compared to select the most suitable ones for controlling the residual concentration of the disinfectant peracetic acid (PAA) and chlorine (sodium hypochlorite, NaOCl) in the process water. Likewise, for controlling the disinfection with chlorine, the influence of four pH regulators (citric acid, phosphoric acid, sulfuric acid and carbonic acid) on the generation of the main DBPs (trihalomethanes (THMs), haloacetic acids (HAAs) and chlorate) was evaluated. The impact in the physicochemical and microbiological characteristics of process water in the chlorine management, their influence in the generation of chlorine gas, and the pH range to maximize the antimicrobial capacity were studied. Previously, a methodology for the determination of HAAs in process water and the produce was validated using UHPLC-MRM, according to the criteria of SANTE/2019/12682 guideline. On the other hand, DBPs were monitored in reclaimed water from Wastewater Treatment Plants (WWTPs) intended for agricultural irrigation.

Fifteen WWTPs were sampled for 6 months to select those disinfection technologies that prevented the formation of DBP and its accumulation for the reuse of reclaimed water for irrigation under safe conditions. Moreover, considering the high consumption and generation of wastewater during the industrial process of plant protein isolation, wastewaters after protein extraction from bean and pea flour were characterized and the presence of value-added by-products (proteins, sugars and polyphenols) was determined.

The main results from the control of process water disinfection showed that chronoamperometric sensor was the recommended method for the determination of residual PAA and chlorine concentration in the process water as no interferences with organic matter or oxidizing agents were observed. Likewise, among all the pH regulators, phosphoric acid was the most suitable because of its wide pH range to achieve the maximum antimicrobial capacity of chlorine, its inorganic nature that limits the formation of THMs and its weak character resulting in less corrosive. For the first time, the relationship between citric acid and the formation of chlorine gas in the processing industry was established. Regarding the disinfection technologies for reclaimed water of WWTPs, the benefits of PAA, UV or PAA/UV, as an alternative to chlorine and chlorine/UV, to reduce the chemical risk of DBPs' presence in recycled water for irrigation, were established. Finally, wastewater generated from protein isolation showed high organic matter content, revealing an environmental impact in case of discharge and the need for treatment. Membrane technologies for the retention of soluble compounds are good strategies before wastewater discharge. These wastewaters were optimal for their potential valorization, showing the first water fractions derived from protein extraction of faba the highest content of polyphenols.

Listado de abreviaturas y símbolos

ACN	Acetonitrilo
ACS	Sociedad Americana de Química
ACV	Análisis del ciclo de vida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADS	2-([3-{2-[4-Amino-2-(metilsulfanil)fenil]-1-diazenil} fenil]sulfonil)-1-etanol
ADSO	2-([3-{2-[4-Amino-2-(metilsulfoxi)fenil]-1-diazenil} fenil]sulfonil)-1-etanol
AECOSAN	Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición
AFHORLA	Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas y Listas para su empleo
AHDB	Agriculture and Horticulture Development Board
ANOVA	Análisis de la varianza
AOPs	Procesos de oxidación avanzada (advanced oxidation processes)
APHA	Asociación Americana de Salud Pública (American Public Health Association)
APPCC	Análisis de peligros y puntos de control crítico
Bar	Bares
BAT	Bacterias aerobias totales
BCAA	Ácido bromocloroacético
BDCAA	Ácido bromodiclوروacético
BDCM	Bromodiclورometano

BE	Biofiltro electroactivo
BOE	Boletín Oficial del Estado
BREF	Documento de referencia de mejores técnicas disponibles
°C	Grado Celsius
Ca(ClO)₂	Hipoclorito de calcio
CAC	Comisión del Codex Alimentarius
CAR	Carboxen
CDBAA	Ácido clorodibromoacético
CDBM	Clorodibromometano
CDC	Centros para la Prevención y el Control de las Enfermedades (Centres for Disease Prevention and Control)
CE	Comunidad Europea
CE	Conductividad eléctrica
CEBAS-CSIC	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura del Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CH₃C(O)O•	Radical acetiloxilo
CH₃C(O)OO•	Radical acetilperoxilo
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
Cl•	Radical cloro
Cl₂	Cloro gas
(Cl₂•)	Radical dicloro
ClO⁻	Ión hipoclorito

ClO•	Radical óxido de cloro
ClO₂⁻	Clorito
ClO₂	Dióxido de cloro
ClO₃⁻	Clorato
ClO₄⁻	Perclorato
ClOH•⁻	Radical anión cloro-hidróxido
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
COT	Carbono orgánico total
COVID	Enfermedad del coronavirus
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBAA	Ácido dibromoacético
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DBPs	Subproductos de desinfección
DCAA	Ácido dicloroacético
DG SANTE	Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria
DPD	N,N-dietil-p-fenilendiamina
DQO	Demanda química de oxígeno
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
DVB	Divinilbenceno
EC50	Concentración efectiva media

ECD	Detector de captura de electrones
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control)
ECETOC	Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología de Productos Químicos
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF	Efluente
EFS	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
ESAMUR	Entidad Regional de Saneamiento y Depuración de la Región de Murcia
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FCC	Food Chemicals Codex
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
g	Gramo
GC	Cromatografía de gases
h	Hora
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno

HAA5	Suma de ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido monobromoacético y ácido dibromoacético.
HAA9	Suma de ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido monobromoacético, ácido dibromoacético, ácido tribromoacético, ácido bromocloroacético, ácido bromodicloroacético y ácido clorodibromoacético
HAAs	Ácidos haloacéticos
HBrO	Ácido hipobromoso
HCl	Ácido clorhídrico
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
HIO	Ácido hipoyodoso
hm³	Hectómetro cúbico
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSD-Tukey	Prueba de significancia honesta de Tukey
IC	Cromatografía iónica
ILIS	Patrón interno marcado isotópicamente
ILSI	International Life Science Institute
IN	Influente
INE	Instituto Nacional de Estadística
INSST	Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo
IR	Detector de índice de refracción

ISO	Organización Internacional de Normalización
IT	Analizador de trampa de iones
J	Julio
kg	Kilogramo
KI	Yoduro potásico
kJ	Kilojulio
km³	Kilómetro cúbico
kV	Kilovoltio
L	Litro
LC	Cromatografía líquida
LoD	Límite de detección
Log	Logaritmo decimal
LoQ	Límite de cuantificación
M	Molaridad
m³	Metro cúbico
MBAA	Ácido monobromoacético
MCAA	Ácido monocloroacético
Mdsocialesa2030	Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030
ME	Efecto matriz
CH₄	Metano
mg GAeq	Miligramos de ácido gálico equivalentes

mg	Miligramo
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMA	Ministerio de Medio Ambiente
MRM	Espectrómetro de masas mediante monitoreo de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
mS	Milisiemens
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSD	Detector selectivo de masas
MSⁿ	Espectrometría de masas en tándem en múltiples etapas
MTD	Mejores Técnicas Disponibles
MU	Medida de la incertidumbre
mV	Milivoltio
N	Normalidad
NaClO₂	Clorito de sodio
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCI	National Cancer Institute
NCl₃	Tricloramina
NF	Nanofiltración

NH₂Cl	Monocloramina
NHCl₂	Dicloramina
NIS	Contranportador sodio-yoduro
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
nm	Nanómetro
NOM	Materia orgánica natural
Ns	No significativo
O₂	Oxígeno
O₃	Ozono
•OH	Radical hidroxilo
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
OLS	Regresión lineal simple
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
ORP	Potencial de oxidación-reducción
PAA	Ácido peracético o ácido peroxiacético
PAO	Óxido de fenilarsina
PCA	Recuento en placa de agar
PDMS	Polidimetilsiloxano
PES	Poliétersulfona
PFA	Paraformaldehído

psi	Unidad inglesa de presión libra por pulgada cuadrada
PTFE	Politetrafluoroetileno
QqQ	Espectrómetro de masas triple cuadrupolo
QuPPE	Quick Polar Pesticides Method
R²	Coefficiente de determinación
RCS	Especies reactivas de cloro
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estandar relativa
RSDr	Repetibilidad
RSD_{WR}	Precisión intermedia
s	Segundos
SARS-CoV-2	Síndrome respiratorio agudo severo
SDT	Sólidos disueltos totales
SIM	Selected ion monitoring
SPME	Microextracción en fase sólida
SST	Sólidos en suspensión totales
ST	Sólidos totales
T^a	Temperatura
TBAA	Ácido tribromoacético
TBM	Tribromometano
TCAA	Ácido tricloroacético

TCD	Detector de conductividad térmica
TCM	Triclorometano o cloroformo
THM4	Suma de triclorometano, bromodiclorometano, clorodibromometano y tribromometano.
THMs	Trihalometanos
t	Tonelada
TOX	Halógenos orgánicos totales
UE	Unión Europea
UF	Ultrafiltración
UFC	Unidad formadora de colonia
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
UNESCO	Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltio
VBNC	Viable pero no cultivable
VIS	Radiación visible

WHO IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization International Agency for Research on Cancer)
WHO	World Health Organization
WLS	Regresión lineal mediante mínimos cuadrados ponderados
WRI	World Resources Institute
X_{exp}	Valor de concentración obtenido experimentalmente
x_g	Unidad de medida de fuerza centrífuga
X_{theo}	Valor teórico de concentración
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μS	Microsiemens
%ER_{AVER}	Promedio del porcentaje de error relativo de la curva de calibración
%ER_{MAX}	Porcentaje máximo de error relativo de la curva de calibración
%	Porcentaje

Listado de figuras y tablas

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Reservas mundiales de agua.

Figura 1.2. Flujo del producto y consumos de agua durante el procesado de frutas y hortalizas.

Figura 1.3. Distribución relativa de las principales especies de cloro en función del valor de pH.

Figura 1.4. Etapas del proceso de desinfección con cloro en agua.

Figura 1.5. Parámetros de control de la desinfección del agua de proceso.

Figura 1.6. Flujo del producto y posible gestión eficiente del agua durante el procesado de frutas y hortalizas.

Figura 1.7. Líneas de agua y de fangos en una Estación Depuradora de Aguas Residuales.

Figura 1.8. Principales parámetros que influyen en la formación de los subproductos de desinfección (DBPs).

Figura 1.9. Estructura molecular de los THMs (X representa los halógenos).

Figura 1.10. Estructura molecular de los HAAs (X representa los halógenos).

Tabla 1.1. Ventajas e inconvenientes de distintas tecnologías de desinfección para aguas del sector hortofrutícola.

Tabla 1.2. Subproductos de desinfección (DBPs) asociados a los principales desinfectantes.

Tabla 1.3. Límite máximo residual de los distintos subproductos de desinfección (DBPs) para agua potable.

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Sistema dinámico simulando tanque de lavado de una línea comercial de producto fresco.

Figura 3.2. Proceso de extracción alcalina de proteínas de harina de haba y guisante.

Figura 3.3. Proceso de extracción ácida de proteínas de harina de haba y guisante.

Figura 3.4. Oxidación de ADS a ADSO por la acción del PAA.

Figura 3.5. Productos de la reacción del cloro con el DPD.

Figura 3.6. Procedimiento de extracción para la lechuga cortada.

Fotografía 3.1. HPLC-DAD-ESI-IT (MSn) 1200 series (Agilent).

Fotografía 3.2. HPLC-DAD 1290 Infinity (Agilent).

Fotografía 3.3. Kit de valoración volumétrica (Drop titration kit, AquaPhoenix Scientific).

Fotografía 3.4. Reflectómetro (RQflex® 10 reflectometer, Merck).

Fotografía 3.5. Sensor amperométrico (Citroside® System, Productos Citrosol S.A).

Fotografía 3.6. Sensor cronoamperométrico (Kemio, Palintest).

Fotografía 3.7. Método espectrofotométrico del DPD (Test cloro y Spectroquant NOVA60).

Fotografía 3.8. Valorador amperométrico (785 DMP Titrino, Metrohm).

Fotografía 3.9. Sensor amperométrico para el cloro (Dulcotest CLR 1, ProMinent).

Fotografía 3.10. GC-TCD (CG-14B Shimadzu).

Fotografía 3.11. GC-MSD 5975C series inert MSD (Agilent).

Fotografía 3.12. UHPLC-ESI-QqQ 1290 infinity, 6460 (Agilent).

CAPÍTULO IV

Figura 4.1. Cromatograma que muestra la separación y detección de ADS y ADSO a una longitud de onda ($\lambda=410$ nm), así como su identificación mediante los espectros UV-VIS, en agua de lavado de manzana con 50 mg L^{-1} de ácido peracético (PAA) y 500 mg L^{-1} de carbono orgánico total (COT).

Figura 4.2. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de manzana utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de COT, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p<0.05$).

Figura 4.3. Cuantificación del ácido peracético (PAA) en un segundo ensayo en agua de lavado de manzana (A), tomate (B), pimiento (C) y limón (D). Para cada nivel de COT el asterisco indica diferencias significativas de cada metodología con el sensor cronoamperométrico, según la prueba t de Student ($p<0.05$).

Figura 4.4. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de tomate utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de COT, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p<0.05$).

Figura 4.5. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de demanda química de oxígeno (DQO) en agua de lavado de pimiento utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de DQO, el asterisco indica diferencias significativas en la

comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

Figura 4.6. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de limón utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de DQO, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

Figura 4.7. Cuantificación de cloro libre utilizando diferentes metodologías en agua sin demanda de cloro y en agua de lavado de lechuga, col lombarda y cebolla cortadas, al aumentar el contenido en materia orgánica medido como demanda química de oxígeno (DQO). Para cada uno de los ensayos, se muestran los resultados entre los valores iniciales y finales de DQO alcanzados en el tanque de lavado. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de nueve réplicas, para el agua sin demanda de cloro y al valor promedio \pm desviación estándar de veinticuatro réplicas para lechuga, col lombarda y cebolla. Las diferentes letras muestran diferencias significativas en la comparación de las distintas metodologías, de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$).

Figura 4.8. Medición del potencial de oxidación-reducción (ORP) para distintas concentraciones de cloro libre a pH constante (5.0-6.0), en agua de lavado de distintos productos (lechuga iceberg, cebolla y col cortadas, así como brotes tiernos). Los valores corresponden a 474 mediciones.

Tabla 4.1. Características físico-químicas incluyendo pH, potencial de oxidación-reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT) en agua de manzana, tomate y limón y demanda química de oxígeno (DQO) en agua de pimienta.

CAPÍTULO V

Figura 5.1. Cromatogramas para los 9 ácidos haloacéticos fortificados a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en solvente (agua ultrapura) (---) y en matriz de agua de lavado (---) y a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ en matriz de lechuga (---). Las intensidades representadas fueron las normalizadas a razón del pico más intenso, para cada transición en las distintas matrices.

Figura 5.2. Efecto matriz (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en (A) agua de lavado con 400 mg L^{-1} de DQO, (B) agua de lavado con 800 mg L^{-1} de DQO y (C) lechuga. Las matrices fueron fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$, para agua de lavado o 5, 20 y $500 \mu\text{g kg}^{-1}$, para lechuga. Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de tres réplicas.

Figura 5.3. Veracidad como % de recuperación absoluta para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en lechuga fortificada con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y $500 \mu\text{g kg}^{-1}$. Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de tres réplicas.

Figura 5.4. Medición de la incertidumbre (MU) expandida (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en (A) agua de lavado y (B) en lechuga, fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs de 5, 20 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para agua de lavado y de 5, 20 y $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para lechuga. Los datos corresponden a quince réplicas para cada uno de los HAAs por nivel de fortificación.

Tabla 5.1. Parámetros para la adquisición de datos mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) y los 5 patrones internos marcados isotópicamente (ILIS), incluyendo los iones precursor y producto y el cálculo de la “relación de iones” en solvente (agua ultrapura), agua de lavado y lechuga.

Tabla 5.2. Ecuaciones para las curvas de calibración basadas en la regresión de mínimos cuadrados ponderados (WLS), coeficiente de determinación (R^2), porcentaje máximo de error relativo ($\%ER_{MAX}$) teniendo en cuenta todos los niveles de la curva de calibración, promedio del porcentaje de error relativo ($\%ER_{AVER}$) de toda la curva de calibración, límite de cuantificación (LoQ) y límite de detección (LoD), para los 9 ácidos haloacéticos en solvente (agua ultrapura), agua de lavado y lechuga.

Tabla 5.3. Efecto matriz (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs), comparando las pendientes de las curvas de calibración en solvente (agua ultrapura), en agua de lavado con una demanda química de oxígeno (DQO) de 400 y de 800 mg L⁻¹ y en lechuga.

Tabla 5.4. Veracidad como % de recuperación, para la matriz de agua de lavado, y como % de recuperación relativa, para la matriz de lechuga, concentración recuperada, precisión como repetibilidad (RSD_r) y precisión intermedia (RSD_{wr}), para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en las matrices fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs de 5, 20 y 500 µg L⁻¹, para agua de lavado, y 5, 20 y 500 µg kg⁻¹, para lechuga.

Tabla 5.5. Estabilidad de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en agua de lavado y en lechuga fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y 500 µg L⁻¹ para agua de lavado y de 5, 20 y 500 µg kg⁻¹ para lechuga. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y -20°C durante 3 y 21 días, respectivamente antes de su análisis.

Tabla 5.6. Concentración de ácidos haloacéticos (HAAs) individuales y totales (HAA9) en agua de lavado y en lechuga fresca cortada proveniente de una industria de IV gama.

CAPÍTULO VI

Figura 6.1. Porcentaje de cloro libre presente en agua clorada como ácido hipocloroso (HOCl) e ión hipoclorito (ClO⁻), en función de pH y utilizando diferentes reguladores de pH: ácido cítrico (A), ácido fosfórico (B), ácido sulfúrico (D) y ácido carbónico (D). Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de cuatro replicas.

Figura 6.2. Cambios en la concentración de cloro libre con niveles de 60, 80, 100, 140 mg L⁻¹ a pH 3.5 y 5.0, cuando se utiliza ácido cítrico (A, B) y ácido fosfórico (C, D), como reguladores de pH, tras 0 min y 15 min de preparación. Las barras corresponden al valor promedio ± desviación estándar de dos réplicas.

Figura 6.3. Cambios en la población de bacterias aerobias mesófilas totales en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5), con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO) y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de dos réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de significancia p<0.05, para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). Ns: no significativo.

Figura 6.4. Cambios en el contenido de clorato en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de tres réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de significancia p<0.05 para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). Ns: no significativo. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7 mg L⁻¹ establecido por la Unión Europea para agua potable.

Figura 6.5. Cambios en el contenido de ácidos haloacéticos (HAA5) en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de tres réplicas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey (p<0.05), para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). La línea discontinua muestra el límite máximo de 60 µg L⁻¹ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable.

Figura 6.6. Cambios en el contenido de trihalometanos (THM4) en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de tres réplicas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey (p<0.05), para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). La línea discontinua muestra el límite máximo de 100 µg L⁻¹ establecido por la Unión Europea para agua potable.

Tabla 6.1. Características físico-químicas del agua de lavado de lechuga clorada comparando diferentes reguladores de pH, incluyendo la demanda química de oxígeno (DQO), pH, concentración de cloro libre y combinado, potencial de oxidación-reducción (ORP), cantidad de cloro añadido y de regulador de pH.

Tabla 6.2. Influencia de los reguladores de pH en el contenido de ácidos haloacéticos individuales y totales (HAA9) (µg L⁻¹) en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre y pH 5.5), para el nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹).

CAPÍTULO VII

Figura 7.1. Niveles de clorato en las muestras de influente de entrada a la depuradora en las 15 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos.

Figura 7.2. Cambio en los niveles de THM4 en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Figura 7.3. Cambio en los niveles de THMs individuales (triclorometano, bromodíclorometano, clorodibromometano y tribromometano) en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias

significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Figura 7.4. Cambio en los niveles de HAA9 en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Figura 7.5. Cambio en los niveles de clorato en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV, PAA/UV y biofiltro electroactivo (BE), de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Figura 7.6. Trihalometanos totales (THM4) e individuales a lo largo de los 13 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección.

La línea discontinua muestra el límite máximo de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea para agua potable. Triclorometano (TCM), bromodichlorometano (BDCM), clorodibromometano (CDBM) y tribromometano (TBM).

Figura 7.7. Trihalometanos totales (THM4) e individuales a lo largo de los 13 muestreos en 12 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea para agua potable.

Figura 7.8. Contenido en HAA9 a lo largo de los 11 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable.

Figura 7.9. Contenido en HAA9 a lo largo de los 11 muestreos en 12 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable.

Figura 7.10. Contenido en clorato a lo largo de 13 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7mg L^{-1} establecido por la Unión Europea para agua potable.

Figura 7.11. Contenido en clorato a lo largo de 13 muestreos en 13 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). Las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7mg L^{-1} establecido por la Unión Europea para agua potable.

Tabla 7.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), localización, fechas de muestreo (día y mes) y sistemas de tratamiento o desinfección: cloro, ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV, PAA/UV y biofiltro electroactivo (BE).

Tabla 7.2. Parámetros físico-químicos de los influentes (IN) de entrada a la depuradora y de los efluentes (EF) tras los distintos tratamientos en 15 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) (A-O).

Tabla 7.3. Cambios en el contenido de THM4, HAA9 y clorato en las muestras de efluente de 5 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) sometidas o no a un proceso de inactivación microbiana.

CAPÍTULO VIII

Figura 8.1. Contenido total de proteínas en (A) las primeras fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante y (B) las segundas fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) en cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), *** ($p<0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

Figura 8.2. Contenido en fenoles totales en (A) las primeras fracciones de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba y guisante y (B) las segundas fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) en cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), ***

($p < 0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

Figura 8.3. Cromatograma HPLC-DAD de la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina (A) y ácida (B) de harina de haba a 360 nm de longitud de onda.

Figura 8.4. Cromatograma HPLC-DAD de la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina (A) y ácida (B) de harina de guisante a 360 nm de longitud de onda.

Figura 8.5. Actividad antioxidante en las primeras fracciones de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p < 0.05$), ** (< 0.01), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

Tabla 8.1. Parámetros físico-químicos de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de la harina de haba.

Tabla 8.2. Parámetros físico-químicos de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de la harina de guisante.

Tabla 8.3. Turbidez (UNT) de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de las harinas de haba y guisante y la influencia de la filtración.

Tabla 8.4. Contenido en sacarosa (mg L^{-1}) de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de las harinas de haba y guisante.

Tabla 8.5. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos en la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba.

Tabla 8.6. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos en la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de guisante.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. RESERVAS Y GESTIÓN DE AGUA DULCE

Las reservas mundiales de agua representan, aproximadamente, 1.4 billones de km^3 . Sin embargo, de entre todas las reservas de agua que posee el planeta, únicamente el 2.5% son de agua dulce. De esa cantidad de agua dulce, la mayor parte se encuentra en estado sólido, formando parte de los glaciares y casquetes polares y por tanto no pudiendo ser aprovechada. El resto se encuentra como aguas superficiales (<0.01%) o aguas subterráneas (0.77%) (**Figura 1.1**). De esta manera, aunque el 70% de la superficie terrestre está cubierta por agua, los recursos de agua dulce potencialmente utilizables son muy escasos (Ölmez, 2013).

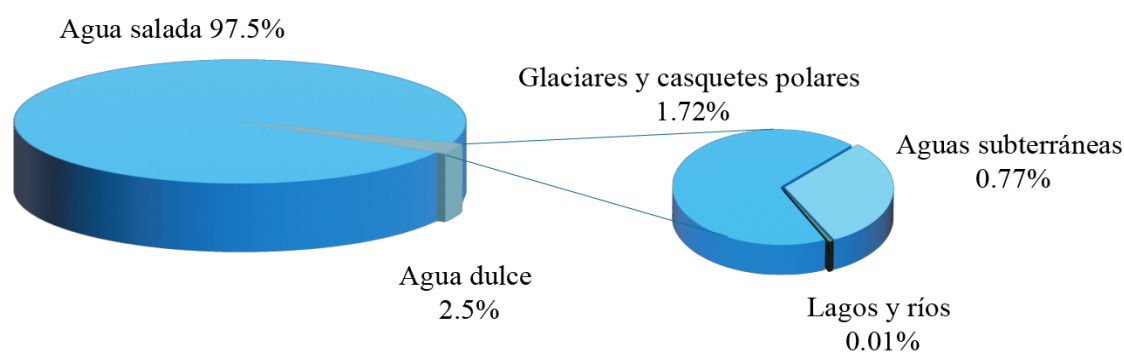


Figura 1.1. Reservas mundiales de agua (Ölmez, 2013).

El cambio climático, el aumento de la población mundial y la continua industrialización son tres de los factores que ejercen una acusada presión sobre los recursos hídricos de agua dulce disponibles (Manzardo y col., 2014; Aivazidou y col., 2016). Además, el cambio en la calidad de las aguas debido a la entrada de contaminantes a través de vertidos de aguas residuales de origen industrial, urbano, ganadero o agrícola repercute negativamente en la disponibilidad de recursos hídricos de calidad (Barceló y López, 2007).

En cuanto al cambio climático, su influencia en los parámetros hidrológicos y meteorológicos debe ser tenida en cuenta, ya que existe una relación entre el cambio climático y la probabilidad de fenómenos meteorológicos extremos, tales como inundaciones y sequías, así como el aumento de la temperatura media (Milly y col., 2008; Watts y col., 2011; Ehsani y col., 2017). Existe, por tanto, una relación entre el cambio climático y la disponibilidad de recursos hídricos, pudiendo afectar al descenso de los niveles freáticos, de caudal, así como a la disponibilidad de suministro del agua de los embalses (Sýs y col., 2021). Cabe destacar que las precipitaciones en España disminuyeron alrededor de un 18% entre los años 1980 a 2010 (Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030 [mdsocialesa2030], 2021). Asimismo, el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos (Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura [UNESCO], 2014) estimó que en 2050 más del 40% de la población mundial vivirá en regiones que se enfrentarán a escasez de agua severa (Aivazidou y col., 2016).

Por otra parte, el aumento de la población, la creciente industrialización y el desarrollo económico ha dado lugar a cambios en el modelo de producción, así como en los patrones de consumo de la población, favoreciendo la competencia entre sectores comerciales dependientes de los recursos hídricos de agua dulce, repercutiendo de forma acusada en la conservación y supervivencia de los mismos (Ercin y Hoekstra, 2014; Aivadizou y col., 2016). Se estima que la población mundial aumentará en un 33% en los próximos 30 años, pasando de los aproximadamente 7.800 millones de personas actuales hasta los 9.700 millones en 2050 e incluso llegando a los 11.000 millones en el año 2100 (Compton y col., 2018; Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2022). Este hecho supone un aumento en la presión ejercida sobre los recursos hídricos del planeta.

Por tanto, aunque durante muchos años el agua ha sido considerado un recurso renovable, teniendo en cuenta su definición como aquel que tras su explotación se puede regenerar volviendo a su nivel de existencias anterior mediante procesos naturales de reposición o recarga, hoy en día y debido a la realidad en cuanto a los recursos hídricos de agua dulce y a la creciente presión que se ejerce sobre los mismos, esta suposición ya no resultaría tan adecuada (Meneses y col., 2017). En este sentido, el indicador 6.4.2. de nivel de estrés hídrico, de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 (cociente entre los recursos de agua dulce utilizados y el total disponible a largo plazo) es del 20.6% en España, representando uno de los mayores de la Unión Europea (Instituto Nacional de Estadística [INE], 2021). En esta misma línea, el Instituto de Recursos Mundiales (World Resources Institute) a través de su herramienta Aqueduct publicó una lista de los Estados Miembros de las Naciones Unidas clasificados por su estrés hídrico, mostrando un estrés hídrico extremadamente alto 17 países los cuales representan una cuarta parte de la población mundial. Asimismo, 44 países, que albergan un tercio de la población mundial, se situaron en niveles altos de estrés hídrico. España ocupó el puesto 28 de esta lista, con niveles altos de estrés hídrico (World Resources Institute [WRI], 2019).

En cuanto a la explotación de los recursos hídricos de agua dulce, el sector agrícola representa el 70% de la explotación mundial, seguido por el sector industrial el cual es responsable del 22% del uso mundial de agua dulce (Rost y col., 2008; UNESCO, 2009; Hossain y col., 2021; UNESCO, 2021). Por último, se encuentra el uso doméstico, utilizando aproximadamente el 8% de los recursos hídricos (Aivazidou y col., 2016). Sin embargo, estos consumos son generales y pueden variar dependiendo de la zona concreta estudiada. Muestra de ello es que el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente apunta que Europa y Estados Unidos son dos de las regiones que consumen

más agua para el sector industrial que para la agricultura (Ölmez y Kretzschmar 2009). En concreto, en Europa la industria consume el 48% de agua, mientras que el sector agrícola usa alrededor del 38% y el 14% es destinado a uso doméstico (Ölmez, 2013). Asimismo, se está observando un creciente incremento en el consumo de agua de estos tres sectores (Tapera, 2019; Asgharnejad y col., 2021). Dentro del sector industrial, la industria alimentaria y de procesamiento de alimentos es una de las que más agua utiliza, después de la industria química y petroquímica. En Europa, la industria alimentaria representa entre el 8% y el 15% del total del agua consumida por el sector industrial, lo que significa entre el 1% y el 1.8% del uso total de agua dulce (Ölmez, 2013). Asimismo, el aumento de la población mundial ha provocado un aumento en la demanda de alimentos y, en consecuencia, una mayor expansión de la industria alimentaria. Se estima que la demanda de alimentos se incremente en un 60% para el año 2050 (UNESCO, 2016; Compton y col., 2018). A razón de esto, en la Cumbre Mundial para la Seguridad Alimentaria de 2009 se debatió que la producción mundial de alimentos debería incrementarse en un 70% para el año 2050 (Food and Agriculture Organization [FAO], 2009; Nikmaram y Rosentrater, 2019). Por tanto, además del gran consumo directo de agua que se necesita para la producción de alimentos en el sector agrícola, la cadena de suministro de la industria alimentaria que se encarga del procesado de los alimentos que provienen del sector agrícola hasta su comercialización, tiene un elevado consumo de agua dulce (Casani y col., 2005). El agua es un recurso esencial para la agricultura y la producción de alimentos, por lo que el desafío de alimentar a una población en continuo crecimiento, con un recurso cada vez más limitado y escaso es evidente.

Ante esta realidad, existe una clara tendencia por parte de las empresas, la política y la sociedad para la identificación, evaluación y gestión de los riesgos asociados a la utilización y agotamiento de los recursos hídricos (Aivazidou y col., 2016). Como un

indicador en el uso del agua a nivel corporativo y de producto, Hoekstra y col. (2011), definieron el concepto de huella hídrica, como el agua dulce necesaria, así como la cantidad de agua contaminada directa e indirectamente, para la fabricación de un producto medida a lo largo de toda la cadena de suministro. En un sentido más amplio, el análisis del ciclo de vida (ACV) consiste en una metodología para evaluar los impactos ambientales derivados en cada una de las etapas de la cadena de producción de un determinado producto o servicio, teniendo en cuenta el consumo de recursos, su eliminación y su posible reciclaje, reutilización y/o valorización (Morawicki, 2011; Meneses y col., 2017). La utilización de estas metodologías para la evaluación del uso del agua, y la posterior proposición de medidas de gestión y conservación de este recurso constituyen herramientas muy útiles para la toma de decisiones, las cuales pueden ser aplicadas a los sectores que representan el mayor consumo de agua mundial, como puede ser el sector agroalimentario (Meneses y col., 2017).

En cuanto al nivel legislativo, la Unión Europea promulgó la Directiva por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, como una de las directrices más avanzadas en el ámbito de la protección de los recursos hídricos, atendiendo a criterios cuantitativos y cualitativos (Diario Oficial de la Unión Europea, [UE], 2000). La transposición de esta Directiva en España se realizó a través del artículo 129 de la Ley de medidas fiscales, administrativas y del orden social (Boletín Oficial del Estado [BOE], 2003a), incluyendo la modificación del texto refundido de la Ley de Aguas (BOE, 2001), el cual fue posteriormente modificado (BOE, 2007a).

A nivel internacional, el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos (UNESCO, 2021) hace referencia al reconocimiento y cuantificación del valor del agua y su incorporación en la toma de decisiones encaminadas a la gestión sostenible de los recursos. Asimismo, esto resulta imprescindible para

alcanzar los ODS de la Agenda 2030 establecida en 2015 y suscrita por los 193 Estados Miembros de las Naciones Unidas. El sexto de los ODS sostiene que los Estados Miembros se comprometen a garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua, así como el saneamiento para todas las personas (mdsocialesa2030, 2021). La consecución específica de este objetivo general se llevará a cabo a través de diferentes metas específicas. La tercera de ellas hace referencia a la mejora de la calidad de las aguas, reduciendo su contaminación y la cantidad de aguas residuales no tratadas y aumentando su reciclado y la reutilización. La cuarta hace referencia a la eficiente utilización de los recursos hídricos en todos los sectores, así como su extracción sostenible. Por último, la quinta meta se centra en la gestión integrada y la cooperación transfronteriza de los recursos hídricos (INE, 2021). En esta línea, Ölmez (2013) aconseja que el uso sostenible de los recursos hídricos debe ser gestionado de manera global e ir más allá de la gestión nacional o regional. Asimismo, el Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos también hace referencia a la ineficiente utilización de los recursos hídricos para la producción alimentaria en muchas de las regiones del mundo, incidiendo en la importancia de las estrategias de gestión para maximizar el valor del agua en la producción alimentaria. Por tanto, se pone de manifiesto que la gestión del agua debe ser uno de los ejes principales en el sector agroalimentario, de manera que se realice un uso sostenible de los recursos hídricos y se asegure el abastecimiento de alimentos a largo plazo para una población en continuo crecimiento (UNESCO, 2021).

2. EL AGUA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Como valor medio, alrededor del 20% del consumo mundial de agua es destinado al sector industrial y se estima que aumente en cuatro veces en el año 2050 (UNESCO,

2015; Oki y Quioco, 2020). En consecuencia, se genera una gran cantidad de aguas residuales que son vertidas anualmente, provocando evidentes problemas medioambientales y de salud (Darban y col., 2020; Malik y col., 2020). Dentro del sector industrial, la industria alimentaria y de procesamiento de alimentos es una de las que más agua y energía consume, así como una de las que más aguas residuales genera (Asgharnejad y col., 2021). En concreto, después de la industria química y petroquímica es la tercera que más agua consume (Ölmez, 2013). Aunque la industria alimentaria no es la que mayor consumo tiene en términos absolutos de cantidad, sí lo es en cuanto a la calidad del agua necesaria para sus procesos. La proporción de agua dulce con respecto al agua total consumida de la industria alimentaria es relativamente alta comparado con el resto de sectores industriales (Casani y col., 2005). Asimismo, en ocasiones, existen empresas alimentarias que se encuentran situadas cerca de áreas urbanas, ocasionando problemas en cuanto a los recursos hídricos disponibles y a la gran cantidad de efluentes producidos, provocando un acusado impacto medioambiental si estos efluentes no son gestionados adecuadamente. Por tanto, bajo este marco de escasez de agua, de regulaciones ambientales cada vez más estrictas y del creciente costo de los tratamientos de las aguas residuales, la industria alimentaria necesita la búsqueda de alternativas para un manejo eficiente y sostenible del agua (Meneses y col., 2017).

La Unión Europea ha clasificado la industria alimentaria en 8 grandes grupos, entre los que se encuentran (Ranken y col., 2012; Asgharnejad y col., 2021):

- Productos cárnicos.
- Pescado, crustáceos y moluscos.
- Frutas y verduras.
- Aceites comestibles.
- Productos lácteos.

- Productos de molienda de cereales.
- Productos de panadería.
- Otros productos alimenticios (café, té, condimentos, azúcar, saborizantes...etc).

2.1. Calidad de las aguas utilizadas en la industria alimentaria

En la industria alimentaria, el agua puede ser utilizada como materia prima o ingrediente o puede estar involucrada en métodos de procesamiento de alimentos u otras operaciones como el lavado, desinfección, transporte y enjuague de los alimentos, operaciones de transferencia de calor (enfriamiento-calentamiento), escaldado, cocción, remojo, producción de vapor, puesta en marcha de líneas de proceso continuo como en pasteurizadores y evaporadores, entre otros. Igualmente, el agua también se puede utilizar para la limpieza y el saneamiento de las instalaciones o para la higiene de los trabajadores (Giner-Santonja y col., 2019). Diversos estudios muestran que la mayor proporción de agua se consume en las operaciones de procesamiento de alimentos en comparación con la cantidad de agua consumida como materia prima (Casani y col., 2005; Asgharnejad y col., 2021). En cuanto a los criterios de calidad de las aguas utilizadas en la industria alimentaria *“todas aquellas aguas utilizadas en la industria alimentaria para fines de fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos o sustancias destinadas al consumo humano, así como a las utilizadas en la limpieza de las superficies, objetos y materiales que puedan estar en contacto con los alimentos”* deberán respetar los criterios de calidad establecidos por el Real Decreto de aguas de consumo humano (BOE, 2003b). Igualmente, el art. 3 de este Real Decreto establece que quedan excluidas *“las aguas que conste a la autoridad sanitaria que la calidad de aquellas no afecta la salubridad del producto alimenticio”*, por lo que las aguas que no estén en contacto con los alimentos o no se utilicen en su procesamiento no deberán seguir estos criterios (BOE,

2003b). En la UE la reciente Directiva relativa a la calidad de aguas de consumo humano ha modificado algunos de los parámetros y/o valores límite que deben respetar estas aguas, estableciendo un plazo para que los Estados Miembros realicen la transposición a su legislación específica (UE, 2020a).

2.2. Consumo, vertidos y características de las aguas residuales

A nivel general, el impacto de la industria alimentaria en el medio ambiente se centra en la contaminación atmosférica, la contaminación del medio acuático por la generación de aguas residuales y la generación de residuos y/o subproductos sólidos. Asimismo, las iniciativas de mejora y sostenibilidad deberían ir orientadas hacia tres ejes principales: el consumo de energía, la reducción y/o reutilización de los desechos sólidos y, como medida más importante, la reducción del consumo de agua y del volumen de aguas residuales generadas (Nikmaram y Rosentrater, 2019). No se dispone de datos actuales sobre el consumo anual de agua por la industria alimentaria. Los datos mencionados en diversas fuentes consultadas hacen referencia a los periodos entre 1991 y 1996 y fue de 347 hm³ en Canadá en 1991, 455 hm³ en Alemania en 1995 y de 247 hm³ en los Países Bajos en 1996 (Dupont y Renzetti, 1998; Fähnrich y col., 1998; Casani y col., 2005). Asimismo, este consumo podrá ser variable en función del sector, la capacidad o el tamaño de la planta, la maquinaria y/o las operaciones de procesado utilizadas, o incluso, la realización de otras operaciones de limpieza que afectan a la cantidad de agua consumida (Shrivastava y col., 2022). El Instituto Nacional de Estadística, dentro de su informe sobre el uso del agua en la industria manufacturera entre 2007 y 2010 publicó los volúmenes de agua utilizados por los diferentes sectores de la industria alimentaria en España, siendo la industria cárnica, la de productos lácteos y la

de preparación y conservación de frutas y hortalizas las que más consumo de agua mostraron (INE, 2013).

En cuanto a la generación de aguas residuales por parte de la industria alimentaria, su vertido supone hasta el 30% del total de las aguas residuales generadas en el sector industrial (Ölmez, 2017). En concreto, en España en el año 2007, el volumen de aguas residuales vertidas en la rama que engloba los sectores de alimentación, bebidas y tabaco fue de 139 hm³, vertiendo el 62% de este volumen a la red de alcantarillado, el 21% al cauce fluvial, el 10% al mar y el 7% a otros destinos (INE, 2013). Sin embargo, esta generación de aguas residuales varía enormemente en función del alimento producido, generando, por ejemplo, 30 m³ de agua residual por tonelada de zanahoria congelada producida, 1.2 m³ en zumo de manzana, 4.15 m³ en la producción de cerveza o 1.7 m³ para las duchas frías durante el procesado de la carne (Casani y col., 2005). El documento de referencia sobre las mejores técnicas disponibles (BREF) en industrias alimentarias, de bebidas y leche, recopiló datos de 353 instalaciones europeas, mostrando que la opción principal de vertido de las aguas residuales fue la descarga a una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) (41%), seguido del vertido directo a un cuerpo de agua receptor, como puede ser el mar o un cauce fluvial (39%), siendo la opción menos utilizada el vertido a tierras de cultivo (4%). En este último caso, únicamente se podrán esparcir aguas beneficiosas para el suelo o la nutrición de los cultivos, y siempre bajo una estricta regulación de valores umbral y medidas de control. En el caso de descarga directa a un cuerpo de agua receptor, las aguas residuales deben ser previamente tratadas. Además, en muchos casos, y dependiendo de la composición de las aguas residuales también deben tratarse parcialmente antes de su vertido a una EDAR (Giner-Santonja y col., 2019). En este sentido, cada vez son más las empresas de este sector, aunque

principalmente las de mayor tamaño, las que instalan depuradoras para el tratamiento de las aguas (Ministerio de Medio Ambiente. MMA, 2006).

Las aguas residuales de la industria alimentaria se caracterizan por contener una gran cantidad de compuestos orgánicos, mostrando altos niveles de parámetros como es la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), así como un alto contenido en sólidos en suspensión totales (SST) (Asgharnejad y col., 2021). Sería necesario definir la DQO, como *“la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la fracción orgánica e inorgánica de una muestra susceptible de ser oxidada por el dicromato potásico en medio ácido”*. Aunque, tal y como se ha comentado, tanto la fracción orgánica como la inorgánica son susceptibles de ser oxidadas, el componente orgánico sería el predominante, por lo que este parámetro es un indicador de la cantidad de materia orgánica presente en las aguas. Asimismo, otro parámetro para expresar la concentración de materia orgánica sería la DBO, definida como *“el valor que representa la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación de la materia orgánica biodegradable mediante la oxidación bioquímica aerobia llevada a cabo por los microorganismos”*. Por último, los SST representan *“aquella cantidad de materia no disuelta y que puede ser separada mediante la filtración del agua a través de un filtro de 0.45 μm ”* (Ruiz-Zapata, 2001). Los sólidos totales (ST), incluye tanto a los SST, como a los sólidos disueltos totales (SDT).

Tal es la carga orgánica de estas aguas, que los niveles de DQO y DBO pueden ser entre 10 y 100 veces aquellos alcanzados por las aguas residuales de origen doméstico (Ölmez, 2017). Estas aguas también pueden contener solventes orgánicos, iones, conservantes, colorantes o edulcorantes artificiales, sustancias volátiles (amoníaco y compuestos orgánicos), nutrientes para las plantas (como fósforo y/o nitrógeno), así como un nivel variable de pH dependiendo del tipo específico de sector estudiado (Giner-

Santonja y col., 2019; Saxena y col., 2020; Shahid y col., 2020; Asgharnejad y col., 2021). Por ejemplo, las aguas residuales de la industria hortofrutícola pueden tener un alto contenido en materia particulada, compuestos orgánicos disueltos, agentes tensioactivos o subproductos de desinfección (DBPs). La industria de productos cárnicos puede contener antibióticos, hormonas de crecimiento o pesticidas, grasas, proteínas, especias, aditivos, fragmentos de piel y otros tejidos (Muñoz-Lucas y Sánchez-García, 2018), mientras que la industria de productos lácteos se caracteriza por contener azúcares disueltos, proteínas, grasas o residuos de aditivos (UNESCO, 2017). Asimismo, la presencia de microorganismos, a veces incluso patógenos, también debe tenerse en cuenta. Por tanto, las características específicas de cada tipo de agua dentro de la industria alimentaria variarán enormemente dependiendo del tipo de sector estudiado.

En la Unión Europea, la Directiva sobre las emisiones industriales establece una serie de medidas para el control, la monitorización y la reducción entre una lista de actividades que incluyen los sectores del procesado de la carne, los vegetales y los lácteos (UE, 2010). También incluye una lista de sustancias contaminantes que pueden verter estas industrias, entre ellas compuestos organohalogenados, materia en suspensión, materia orgánica, metales pesados, así como valores límite de emisión. Asimismo, se muestran las conclusiones sobre las mejores técnicas disponibles (MTD) en las industrias de alimentación, bebida y leche, incluyendo los niveles de emisión de ciertos parámetros (DQO, SDT, DBO, cloruros, nitrógeno total y fósforo total) cuando se produce un vertido directo a una masa de agua receptora, su monitorización, consumo estimado de agua que debe tener este tipo de industrias, medidas para la reducción del consumo y la generación de aguas residuales y metodologías de tratamiento (UE, 2019). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), también elaboró una lista de parámetros cuyos niveles máximos permitidos deben cumplir las aguas residuales provenientes de la

industria alimentaria. Entre ellos destacan los niveles de DQO y DBO, siendo 120 y 40 mg L⁻¹, respectivamente, valores que en la práctica son sobrepasados hasta 20 veces dependiendo las características de las aguas residuales estudiadas (Asgharnejad y col., 2021).

2.3. Manejo sostenible de los recursos hídricos en la industria alimentaria

Con este marco en la utilización, el aprovechamiento y la gestión de los recursos hídricos en la industria alimentaria, queda en evidencia que limitar el consumo de agua y la incorporación de tecnologías de tratamiento de las aguas residuales, para su reutilización y reciclaje en el proceso productivo, así como su posterior vertido bajo el cumplimiento de los requisitos ambientales marcados por la legislación, es una necesidad. Teniendo en cuenta las características de las aguas residuales de la industria alimentaria, la alta carga en compuestos orgánicos es algo común, constituyendo en las aguas potencialmente biodegradables que puedan ser sometidas a distintos tratamientos de limpieza y a su vez ofreciendo una gran oportunidad de recuperación de los compuestos presentes en ellas, siendo algunos de ellos compuestos bioactivos de alto valor añadido (Klemes y col., 2008; Meneses y col., 2017; UNESCO, 2017; Compton y col., 2018). Parte de restos de materias primas en forma de carga orgánica, nutrientes o sólidos en suspensión contenidos en estas aguas pueden ser separados y recuperados tras algún tratamiento (Udugama y col., 2020; Asgharnejad y col., 2021). Por lo que se estima que, si se incorporaran tecnologías para la reutilización y el reciclaje de las aguas residuales de la industria alimentaria, su consumo se reduciría entre un 20 y un 50% (Ölmez y Kretschmar, 2009; Compton y col., 2018). Igualmente, un estudio previo para el conocimiento de los volúmenes de agua específicos utilizados y vertidos en cada paso de la línea de procesado resultaría imprescindible.

Teniendo en cuenta los conocimientos actuales, se puede concluir que la eficiencia de los recursos hídricos del sector de la alimentación, las bebidas y la leche mejorará con las tecnologías de reutilización y reciclaje de las aguas residuales y de proceso, siendo fuentes alternativas de abastecimiento de agua reconocida e integrada por las estrategias de sostenibilidad europeas y nacionales (Giner-Santonja y col., 2019). Asimismo, la implementación de estrategias de reutilización del agua implica una monitorización estricta en cuanto a su calidad microbiológica y química, de manera que no suponga ningún riesgo en cuanto a la seguridad alimentaria (Ölmez, 2013). El Real Decreto, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas indica que en la industria alimentaria se pueden utilizar aguas regeneradas para su uso como agua de proceso y limpieza (BOE, 2007b), entendiéndose como agua regenerada a *“las aguas residuales depuradas que, en su caso, han sido sometidas a un proceso de tratamiento adicional o complementario que permite adecuar su calidad al uso al que se destinan”*.

3. LA INDUSTRIA HORTOFRUTÍCOLA

3.1. Consumo, vertidos y problemática ambiental

Dentro de la industria alimentaria, el procesado de frutas y hortalizas es uno de los sectores que más agua consume. Con una producción en Europa por encima de las 250.000 t anuales, siendo Italia (18.9%), España (14.5%), Alemania (11.8%), Francia (11.35%) y Reino Unido (11.0%) los principales productores. Estos cinco países fueron los responsables de más de dos tercios (67.5%) del total de la producción en 2015 (Giner-Santonja y col., 2019). Un estudio llevado a cabo en 11 industrias de procesado de frutas y hortalizas mostró un consumo de agua anual alrededor de $1.8 \times 10^5 \text{ m}^3$ (Valta y col.,

2016). Las aguas residuales también muestran una alta carga de compuestos orgánicos, pudiendo alcanzar niveles de DQO entre 806 y 7732 mg L⁻¹ (Puchlik y Ignatowicz, 2017; Chen y col., 2019). Asimismo, la generación de aguas residuales de este sector supera los 5-12 hm³ anuales (Lehto, 2019).

Las frutas y hortalizas pueden consumirse directamente en estado fresco (I gama), o bien en conservas o semiconservas (II gama), conservadas por congelación o ultracongelación (III gama), procesadas mínimamente, envasadas y mantenidas en fresco listas para consumir o cocinar (IV gama) y pre-cocinadas, envasadas y conservadas en frío (V gama) (López-Gálvez, 2009). La industria hortofrutícola, pero especialmente la industria de IV gama o de “alimentos mínimamente procesados” ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, y se espera que siga creciendo debido al cambio en los hábitos de los consumidores con una tendencia al consumo más saludable en respuesta a las recomendaciones de varias organizaciones como la OMS, FAO, USDA y EFSA y, por tanto, demandando cada vez más este tipo de productos (Artés y Allende, 2014; Gallego y Cardador, 2016; Nahim-Granados y col., 2020). Asimismo, el ritmo de vida de la sociedad actual también contribuye a la demanda de alimentos frescos “listos para consumir”. Una buena definición de los productos de IV gama sería la de la Asociación Española de Frutas y Hortalizas Lavadas y Listas para su empleo (AFHORLA), que define estos productos como *“frutas y hortalizas frescos sin tratamiento térmico, preparados, lavados y envasados, que han podido ser objeto de troceado, corte o cualquier otra operación relativa a la integridad física del producto, listos para consumir o cocinar, destinados al consumo humano”* (AFHORLA, 2010).

Dentro de la industria hortofrutícola, las industrias de I, III y IV gama consumen una gran cantidad de agua en las etapas de procesado, principalmente en el lavado, y aclarado, etapas donde la calidad del agua es necesaria que se mantenga para asegurar la

calidad y la seguridad de los alimentos lavados y consumidos en fresco. La industria de IV gama muestra elevados consumos, hasta 40 m³/t de materia prima procesada (Nahim-Granados y col., 2020). Otros estudios muestran consumos de agua entre 2-11 m³ /t de producto fresco, así como volúmenes de aguas residuales entre 11-23 m³/t de producto (Ölmez, 2013; Manzocco y col., 2015; Giner-Santonja y col. 2019). Lehto y col. (2014) describieron consumos entre 1.5 y 5.0 m³/ton, en patatas y zanahorias mínimamente procesadas. Asimismo, de forma general, el consumo y la generación de aguas residuales de este tipo de industrias pueden variar atendiendo al producto fresco procesado, así como el momento del día, las variaciones estacionales, la organización y distribución de los sistemas de procesado, patrones de producción y las prácticas de los operadores (Giner-Santonja y col. 2019). Por tanto, los datos de consumo y generación de aguas ponen de manifiesto la elevada huella hídrica de esta industria, especialmente en las etapas de lavado, siendo necesario un cambio hacia la sostenibilidad en el uso del agua dentro de este sector.

3.2. Procesado y gestión del agua en la industria hortofrutícola

En primer lugar, se produce la recepción y la inspección de las materias primas. En esta zona se lleva a cabo una selección y clasificación de las materias primas para que cumplan los estándares de calidad establecidos por cada procesador, atendiendo a criterios de calidad como son la apariencia, frescura, ausencia de fisiopatías, daños por insectos o daños físicos. Seguidamente, los productos son trasladados y, atendiendo al tipo de materia prima, almacenados en una zona con temperatura controlada, o directamente transportados a la zona de procesado (Gil y Selma, 2006; Gil y col., 2014). La zona de procesado es una zona aséptica (zona “limpia”) donde se realizan las operaciones de lavado (Varoquaux y Mazollier, 2002; Garrido, 2016). Como puede

observarse, las diferentes etapas de lavado son las que consumen la mayor parte del agua, llegando a alcanzar casi el 90% del consumo total (**Figura 1.2**).

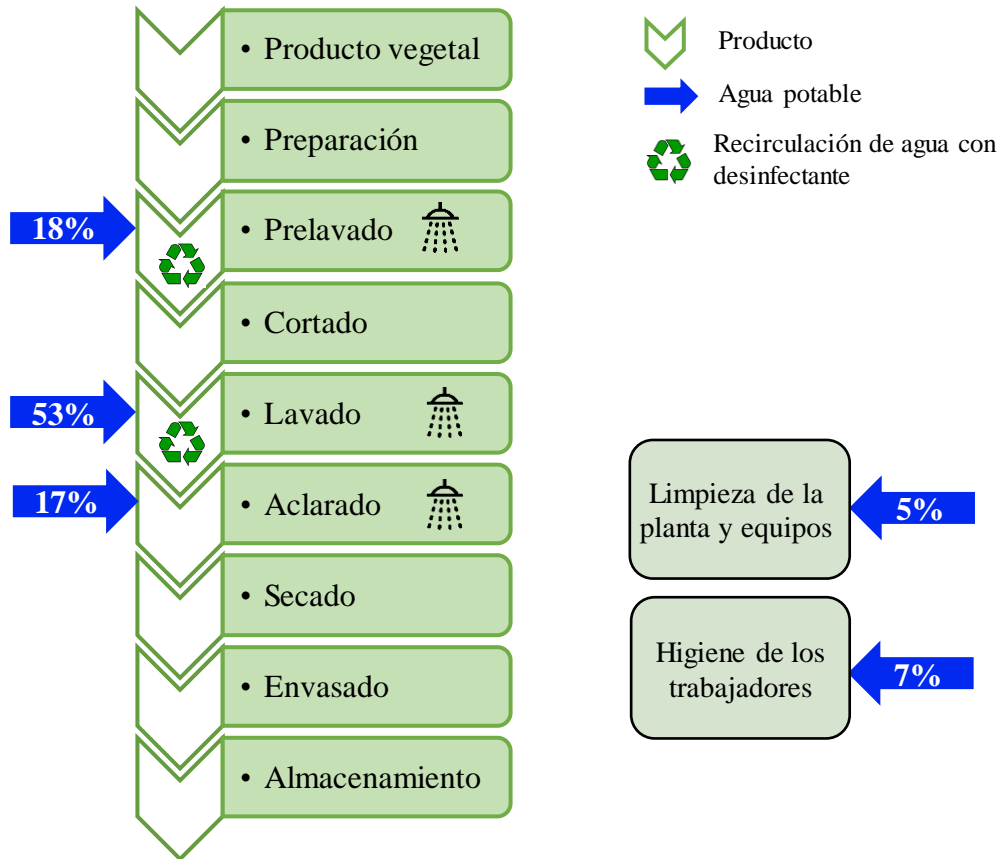


Figura 1.2. Flujo del producto y consumos de agua durante el procesado de frutas y hortalizas (Manzocco y col., 2015).

Cada empresa procesadora puede utilizar diferentes procedimientos para el procesado de las frutas y hortalizas frescas, así como puede variar el diseño de la línea de procesado, tanto en la selección de la maquinaria, en la gestión del proceso de lavado, el uso de lavados simples o dobles, así como en el número de enjuagues posteriores y manejo de la renovación del agua (López-Gálvez y col., 2019; Tudela y col., 2019a). Por lo general, el procesado de las frutas y hortalizas comienza con un prelavado para eliminar los restos y la suciedad que los productos pueden traer del campo. La carga orgánica, incluida la microbiológica, presente en el agua de proceso en este paso aumenta muy

rápidamente, por lo que es necesario una adecuada gestión del agua, con una buena relación producto/volumen de agua, así como la aplicación de tecnologías como la filtración, para mantener la calidad del agua, la renovación periódica y la aplicación de un desinfectante para evitar contaminaciones cruzadas entre el agua y el producto (López-Gálvez y col., 2010; Holvoet y col., 2012; Gil, y col., 2014). El prelavado, de forma general, reduce la carga microbiana del producto entre 1-2 log UFC/100 mL (Narender y col., 2018). Este prelavado se puede realizar por inmersión, sumergiendo los productos y/o haciendo que floten o se puede realizar por duchas (Ahvenainen, 2000; Pao y col., 2012; Lehto, 2019). Asimismo, la posible suciedad y restos que quedan flotando en el agua o hundidos en el tanque de lavado son eliminados mediante un filtro ubicado en el tambor. El agua de lavado de la línea de procesado se encuentra normalmente a baja temperatura (4 °C aprox.), para reducir el deterioro de los productos, conservando su calidad (Suslow, 1997; Zagory, 1999; Simpson y Mitch, 2022).

Durante el procesado los productos se pueden pelar, cortar, picar...etc. Sin embargo, dependiendo del producto y del tipo de procesado que se va a llevar a cabo, estas operaciones se pueden realizar antes o después del prelavado y/o lavado. Seguidamente, los productos pasan al proceso de lavado, donde el agua de proceso tiene una carga microbiológica y orgánica menor que el agua del prelavado. En esta etapa también es necesario llevar una buena gestión del agua, una correcta renovación, así como su desinfección (Gil y col., 2014). Dependiendo del tipo de producto, éstos se pueden lavar una sola vez, o lavarse dos o tres veces y llevar a cabo combinaciones de lavado en tanque y/o aclarado por duchas (Luo, 2007; Lehto, 2019). Posteriormente, el producto pasa por un proceso de aclarado, utilizando duchas para eliminar los restos de desinfectante (Gil y col., 2005), seguido de un proceso de eliminación del exceso de agua y humedad, utilizando centrifugas, túneles de aire templado o de frío polar (Varoquaux y

Mazollier, 2002; Garrido, 2016). Por último, los productos son envasados y conservados en condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa y atmósfera de conservación.

Teniendo en cuenta el consumo de todas las etapas descritas en la línea de proceso (**Figura 1.2**), las diferentes etapas de lavado son las que más agua consumen. Analizando cada etapa por separado vemos que los procesos de prelavado, lavado y aclarado consumen alrededor del 18%, 53% y 17%, respectivamente. Estos procesos generan a su vez un gran volumen de aguas residuales. Asimismo, el resto del agua consumida (alrededor del 12%) se destina a las necesidades de higiene de los trabajadores y a la limpieza de la planta y de los equipos (Manzocco y col., 2015).

3.3. Características de las aguas residuales de la industria hortofrutícola

Debido al importante consumo de agua, los procesos de prelavado, lavado y aclarado generan una gran cantidad de aguas residuales. De forma general, estas aguas suelen contener una gran cantidad de SST, resultante de los restos y la suciedad que contienen los productos que vienen del campo, así como un alto contenido en materia orgánica, proveniente de desechos, exudados, y carga microbiana, caracterizadas por las altas concentraciones de DQO y DBO. Asimismo, los SDT es otro parámetro a tener en cuenta en la caracterización de estas aguas. Debido a la utilización de fertilizantes en el cultivo de los vegetales, también pueden tener altos contenidos en nitrógeno y fósforo total. Por otro lado, los restos de fertilizantes también pueden contribuir al aumento de la materia orgánica en estas aguas (Nougadère y col., 2020; Asgharnejad y col., 2021). Teng y col. (2021), estudiaron la composición del agua de lavado de diferentes productos cortados (lechuga romana, lechuga iceberg, cebolla y zanahoria), determinando el contenido en azúcares, proteínas, péptidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Los

resultados de este estudio mostraron diferencias en cuanto al tipo de producto lavado, observando que la concentración de estos compuestos en el agua de lavado era el doble en cebolla y zanahoria cortada que en lechuga. Asimismo, en cuanto a la composición de estas aguas de lavado, los azúcares fueron los compuestos predominantes en todas ellas, seguido por las proteínas y péptidos, siendo los ácidos orgánicos el tercer grupo más abundante, seguido de los compuestos fenólicos. Asimismo, la concentración de DQO en las aguas de lavado estudiadas fue aumentando en orden decreciente en cebolla > zanahoria > lechuga romana > lechuga iceberg.

Por otra parte, en la caracterización del agua de lavado de patatas y zanahorias proveniente de cuatro procesadores diferentes, Lehto y col. (2014) obtuvieron resultados de DQO, DBO, ST, nitrógeno y fósforo total de 22300, 14300, 12400, 220 y 46 mg L⁻¹, respectivamente. Asimismo, López-Gálvez y col. (2019) demostraron que la carga orgánica del agua de proceso aumenta relativamente rápido durante el procesado industrial de las frutas y hortalizas. En concreto, a lo largo de 5 horas la DQO en hojas jóvenes aumentó de 25 a 112 mg L⁻¹, en lechuga cortada desde 72 a 298 mg L⁻¹ y en hortalizas ralladas (zanahoria, col y tomate) desde 448 a 7092 mg L⁻¹. Asimismo, los distintos tipos de productos y el tipo de procesado (producto entero, pelado, cortado, rallado o troceado) influyen en los parámetros físico-químicos y microbiológicos del agua de proceso. En un estudio reciente, Tudela y col. (2019b) mostraron que la DQO del agua de proceso de la lechuga rallada fue el doble que la de la lechuga troceada (1000-1800 mg L⁻¹ frente a 500-900 mg L⁻¹, respectivamente). Asimismo, también existen diferencias entre el agua residual procedente de los procesos de prelavado y lavado. Como ya se comentó anteriormente, el agua de la etapa de prelavado recibe los productos sin lavar que liberan los restos de suciedad del campo, desechos y exudados, teniendo estas aguas una carga orgánica mayor que las aguas de lavado o aclarado. En cambio, las zonas de

lavado y aclarado reciben productos más limpios, por lo que la carga orgánica es menor (López-Gálvez y col., 2019). Todo esto pone en evidencia las diferencias que existen en la composición del agua de proceso, atendiendo a la etapa de lavado, tipo de producto o tipo de procesado llevado a cabo.

3.4. Calidad y seguridad de las aguas de proceso

Las frutas y hortalizas se pueden contaminar en cualquiera de las etapas de producción y procesado, desde el cultivo en el campo hasta el consumidor final. Asimismo, los productos frescos pueden ser una vía de transmisión de microorganismos patógenos, algunos de ellos capaces de provocar enfermedades cuando son consumidos crudos (Nguyen-the y Carlin, 1994; Beuchat, 1996; Abadias y col., 2008). Por lo tanto, las frutas y hortalizas frescas contaminadas pueden ser vehículos de transmisión de microorganismos patógenos, causando brotes de toxiinfecciones alimentarias cuando éstas son consumidas (Lehto, 2019). En la UE, en el año 2020 el 1.6% y el 4.8% de los brotes de enfermedades alimentarias estaban relacionadas con el consumo de frutas y hortalizas, respectivamente, así como de sus zumos o productos derivados (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control [EFSA/ECDC], 2021).

Durante la cosecha, y el procesado de los productos frescos, si el agua utilizada está contaminada, puede ser un importante vector de contaminación microbiológica (Rico y col., 2007). Concretamente, el agua puede ser portadora de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, de protozoos como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, así como hongos

productores de micotoxinas o virus entéricos como norovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, y adenovirus (Zhao y col., 2007; International Life Science Institute [ILSI], 2008; Zoellner y col., 2018). En base a estudios previos se ha visto que la carga microbiana de los productos frescos después de la cosecha puede oscilar entre 5 y 10 log UFC/100 mL, dependiendo del tipo de producto, del sistema de cultivo, de la época del cultivo, así como de los procedimientos utilizados en las prácticas agrícolas (abonado, riego, y fertilización, principalmente) y en el manejo en la recolección (Ölmez y Kretzschmar, 2009; Barth y col., 2010). Asimismo, las operaciones de corte durante el procesado pueden aumentar la carga microbiana de estos productos, comprometiendo más aún la seguridad y calidad de los mismos (Ragaert y col., 2007; Manzocco y col., 2015). Esto es debido a que el corte causa daños en el tejido, eliminando las capas protectoras del mismo, acelerando su deterioro y proporcionando una vía de entrada para los microorganismos, incluidos los patógenos alimentarios, así como contaminantes químicos (Artés y Allende, 2014; Gallego y Cardador, 2016).

En el lavado de las frutas y hortalizas, el agua puede jugar un papel fundamental para la reducción de la carga microbiana y la posible contaminación presente en el producto vegetal, pero también puede ayudar a la transmisión de microorganismos patógenos de un producto contaminado a otro sin contaminar, a través de lo que se conoce como contaminación cruzada (Gil y col., 2009). Si las etapas de prelavado y lavado se realizan únicamente con agua, el arrastre producido por el agua sobre la superficie del producto podría reducir la carga microbiana en 1-2 log UFC/100 mL. Sin embargo, cuando sólo se usa agua, la calidad microbiológica del agua disminuye rápidamente, siendo necesaria para mantener una calidad adecuada la renovación continua y evitar procesos de contaminación cruzada. A pesar de las renovaciones frecuentes, es necesario añadir un desinfectante al agua de proceso para que el agua se pueda utilizar para lavar

una mayor cantidad de producto vegetal, y por lo tanto utilizarse durante más tiempo, siendo esta gestión de los recursos hídricos positiva en la industria hortofrutícola (**Figura 1.2**). Por este motivo, con la desinfección del agua de proceso se reducen las cantidades totales de agua necesarias para las etapas de lavado de las frutas y hortalizas (Manzocco y col., 2015). Aunque el lavado puede reducir ligeramente la carga microbiana de la superficie de los productos vegetales, incluidos los microorganismos patógenos, una vez que un producto está contaminado, estos microorganismos patógenos no se pueden llegar a eliminar totalmente, ya que pueden quedar acantonados en las irregularidades de la superficie como grietas, estomas y zonas de corte. Es por eso que la función principal del lavado y de la desinfección del agua de proceso no es eliminar la contaminación de un producto contaminado, sino mantener la calidad microbiológica del agua de proceso y evitar así la contaminación cruzada (Gil, 2021).

Tal como se ha comentado anteriormente, el agua utilizada en las etapas de lavado no debe suponer ningún riesgo para el alimento al entrar en contacto directo con el mismo (BOE, 2003b). Asimismo, dentro del programa de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC), se debe realizar una verificación de la calidad microbiológica del agua, identificando los riesgos que suponen su uso para la seguridad alimentaria, de manera que se eviten los peligros relacionados y se cumpla con la reglamentación vigente, garantizando una adecuada higiene, así como la inocuidad de los alimentos producidos (Comisión del Codex Alimentarius [CAC], 1969). En el Codex se utilizan dos categorías de calidad de agua: “potable” y “limpia”, donde limpia se considera de menor calidad que potable. El término “agua limpia”, es definido por la Comisión del Codex Alimentarius como “agua que no comprometa la seguridad de los alimentos en el contexto de su uso”. El desafío para esas autoridades competentes del Codex es cómo traducir esta recomendación del uso de agua limpia para productores primarios y procesadores de

alimentos, permitiéndoles monitorear dichos objetivos como parte de sus programas de control y de gestión de la inocuidad de los alimentos. En el último informe sobre seguridad y calidad del agua utilizada en la pre y postcosecha de frutas y hortalizas frescas (FAO/WHO, 2021) se introduce la idea de que la calidad del agua utilizada podría ser variable en función del propósito o la función específica para la que se va a utilizar, respetando siempre los criterios mínimos de calidad microbiológica y los principios del programa de APPCC. Según las últimas recomendaciones, aunque el agua que entra en contacto directo con el producto o sus superficies de contacto debe tener la calidad de “agua potable”, ésta podría variar ligeramente dependiendo de la etapa de procesado, utilizándose “agua limpia” durante las etapas iniciales de lavado y realizando los aclarados finales del producto con agua de calidad “potable”. Asimismo, para el aseguramiento de la calidad microbiológica de las aguas de proceso se propone la monitorización regular de diferentes microorganismos como *Escherichia coli*, *Enterococcus*, coliformes fecales o totales, como indicadores de patógenos bacterianos, la monitorización de bacteriófagos como indicadores de virus, así como las esporas de *Clostridium perfringens* como indicadores de protozoos. Sin embargo, para el aseguramiento de la calidad microbiológica del agua de proceso, esta monitorización se debe completar con el efectivo control de la concentración residual de desinfectante, necesaria para la inactivación de los microorganismos más resistentes.

3.5. Tecnologías de desinfección para las aguas del sector hortofrutícola

La desinfección del agua de proceso se puede llevar a cabo mediante diversas estrategias, que incluyen tratamientos químicos y físicos, así como la combinación de ambos. En la **Tabla 1.1** se exponen diversas ventajas e inconvenientes de cada una de las tecnologías de desinfección que se describen a continuación.

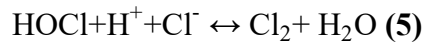
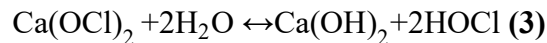
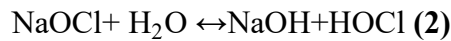
Tabla 1.1. Ventajas e inconvenientes de distintas tecnologías de desinfección para aguas del sector hortofrutícola.

Tecnología de desinfección	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Hipoclorito y compuestos relacionados	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo precio -Fácilmente disponible -Baja peligrosidad -Fácil control y medición 	<ul style="list-style-type: none"> -Formación de subproductos de desinfección (DBPs) -Actividad dependiente de pH -Eficacia afectada por la presencia de materia orgánica -Sensible a la temperatura, luz y aire -Volatilización de cloro gas a pH bajo -Cambios sensoriales en el producto -Fitotoxicidad alta -Corrosivo -Prohibido en algunos países europeos 	<p>Manzocco y col., 2015</p> <p>Ölmez y Kretzschmar, 2009</p> <p>Sánchez y col., 2020</p>
Cloro gas (Cl₂)	<ul style="list-style-type: none"> -Bajo precio 	<ul style="list-style-type: none"> -Necesidad de control automatizado de inyección y ajuste continuo de pH -Volatilización en medio muy ácido -Irritante de las mucosas y el sistema respiratorio -Explosivo a altas temperaturas 	<p>Suslow, 1997</p> <p>CDC, 2018</p> <p>Mishra y col., 2018</p>
Dióxido de cloro (ClO₂)	<ul style="list-style-type: none"> -Potencial de oxidación mayor al del ácido hipocloroso (HOCl) 	<ul style="list-style-type: none"> -Formación de DBPs inorgánicos (clorato, clorito) -Necesidad de generación “in situ” 	

	<ul style="list-style-type: none"> -Alto poder de desinfección -Mayor eficacia antimicrobiana que el cloro a pH neutro -Alta solubilidad en agua fría -Menos corrosivo que el cloro 	<ul style="list-style-type: none"> -Explosivo a concentraciones >10% o temperaturas >130 °C -Irritante de las mucosas y del sistema respiratorio 	<p>OMS, 2000 Manzocco y col., 2015 Ölmez y Kretzschmar, 2009</p>
<p>Ácido peracético (PAA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Baja formación de DBPs -Activo a bajas concentraciones y con amplio espectro de actividad antimicrobiana -Mayor costo -Eficacia independiente de la carga orgánica del agua -Menor dependencia del nivel de pH -Eficacia en un amplio rango de temperatura -No corrosivo (<80 mg L⁻¹) 	<ul style="list-style-type: none"> -Cinética de inactivación microbiana más lenta -Se necesitan altas dosis para la inactivación de esporas bacterianas y quistes de protozoos -Inestabilidad a concentraciones >15% 	<p>Kitis, 2004 Manzocco y col., 2015 Ölmez y Kretzschmar, 2009 Sánchez y col., 2020</p>
<p>Radiación ultravioleta (UV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Baja o inexistente formación de DBPs -Fácil instalación y mantenimiento -Bajo precio -Posibilidad de combinar con otras tecnologías en procesos de oxidación avanzada (AOPs), con mayor capacidad biocida (cloro/UV, PAA/UV) 	<ul style="list-style-type: none"> -Baja efectividad en aguas con alta turbidez y en zonas de sombra donde no llegue la radiación 	<p>Sánchez y col., 2020 Simpson y Mitch, 2022</p>

3.5.1. El cloro y los compuestos clorados

El cloro es uno de los desinfectantes principales más utilizados debido a que es un potente oxidante, de bajo costo y fácil de utilizar (Gil y col., 2009; Manzocco y col., 2015). Es soluble en agua, tanto el cloro gas (Cl_2) como las sales de hipoclorito de sodio (NaOCl) e hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) (Suslow, 1997). En solución acuosa, estas formas son disociadas en ácido hipocloroso (HOCl), (**Ecuación 1-3**) el cual es un ácido débil cuya disociación da lugar al ión hipoclorito (OCl^-) (**Ecuación 4**) y al Cl_2 (**Ecuación 5**).



Según el pH se observan diferentes distribuciones de las especies de cloro acuoso a una temperatura dada de 25 °C. En concreto, el HOCl será la especie dominante cuando el rango de pH oscila entre 4.0-6.0. En cambio, bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7.0$) el OCl^- será la especie predominante. Por último, niveles de pH muy bajos favorecerán la formación de Cl_2 , volatilizándose y siendo en este caso una especie nociva e irritante de las mucosas y del sistema respiratorio (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo [INSST], 1994.; Deborde y von Gunten, 2008; Desiderio y Nibbering, 2010; White y Martin, 2010) (**Figura 1.3**).

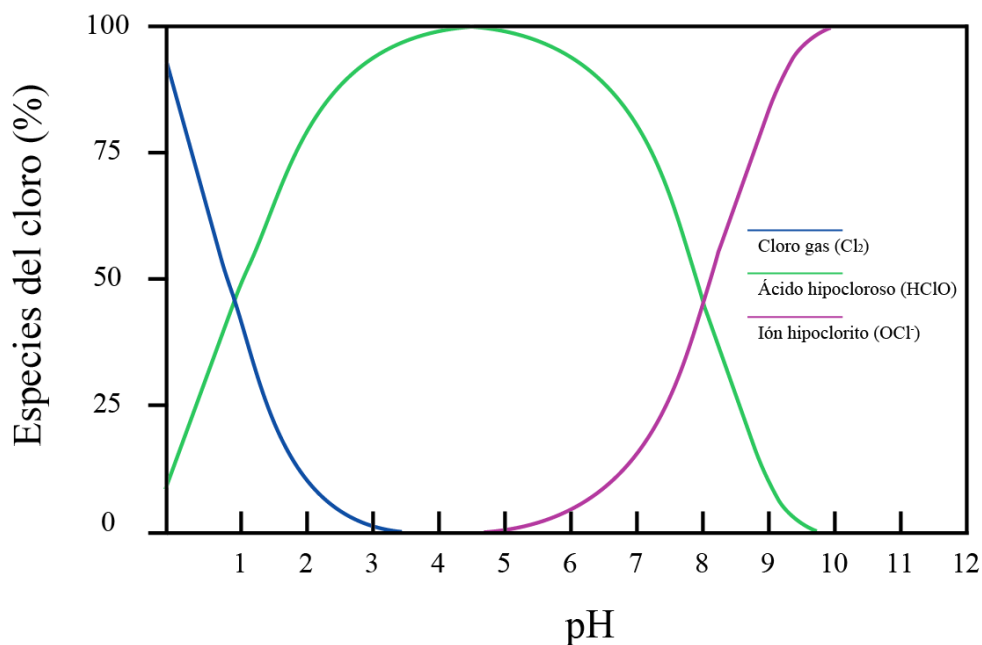


Figura 1.3. Distribución relativa de las principales especies de cloro en función del valor de pH (Deborde y von Gunten 2008).

El HOCl es, de todas las especies del cloro en agua, la que tiene mayor poder antimicrobiano, por lo que la actividad antimicrobiana de los compuestos del cloro depende en gran medida de la cantidad de HOCl presente en el agua tras el tratamiento aplicado (Suslow, 2001; Desiderio y Nibbering, 2010). Su actividad antimicrobiana reside en la degradación oxidativa de la membrana celular, proteínas y ácidos nucleicos, siendo la sensibilidad de los diferentes microorganismos diferente (McDonnel y Russel, 1999; Mishra y col., 2018). También presenta su acción antimicrobiana inhibiendo enzimas esenciales, produciendo la oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilo (Chaidez y col., 2012). Asimismo, se ha observado que no inactiva algunos virus y otros microorganismos, tales como el complejo de bacterias *Mycobacterium avium*, las cuales forman biopelículas dentro de los sistemas de distribución de agua (Shannon y col., 2008; Manzocco y col., 2015). En la gestión del cloro es importante maximizar la concentración de HOCl y minimizar todas las demás formas del cloro. El ClO⁻ posee cierta actividad

antimicrobiana a tiempos largos de contacto, pero no tiene una actividad oxidante eficaz para el adecuado manejo de la desinfección del agua de lavado. Por este motivo, el control del pH es el factor más importante a la hora de gestionar la eficacia del cloro, de manera que se debe maximizar la concentración de HOCl, pero sin que el pH esté tan bajo como para que se ocasione la formación de Cl₂, el cual no constituye un desinfectante eficaz para el agua, pudiendo además provocar problemas de salud a los trabajadores y la corrosión de los equipos (Suslow, 2001).

En el proceso de desinfección con cloro se distinguen distintas etapas. En primer lugar, el cloro se consume debido a su reacción con la materia orgánica e inorgánica presente en el agua, lo que produce un aumento en la demanda de cloro (**Figura 1.4 (A)**). Seguidamente, éste reaccionará con los compuestos nitrogenados, principalmente amoníaco presente en el agua, formando cloraminas (mono, di y tricloraminas) (**Ecuaciones 6-8**), las cuales, aunque también tienen poder desinfectante, poseen menor capacidad antimicrobiana (Suslow, 1997). En esta etapa el cloro también reaccionará con los compuestos orgánicos presentes en el agua, formando compuestos organoclorados. Esta reacción continuará hasta la mayor formación de cloraminas y compuestos orgánicos de cloro (**Figura 1.4 (B)**). Sin embargo, si se sigue aumentando la dosis de cloro, los compuestos formados serán oxidados (**Figura 1.4 (C)**) hasta lo que se conoce como “punto de ruptura”, a partir del cual el cloro quedará como cloro libre residual, disponible para su acción desinfectante (**Figura 1.4 (D)**) (Domínguez-Tello, 2017). Sin embargo, la formación de cloraminas, normalmente, es mínima debido a la baja concentración de compuestos nitrogenados, como amoníaco, durante la desinfección.

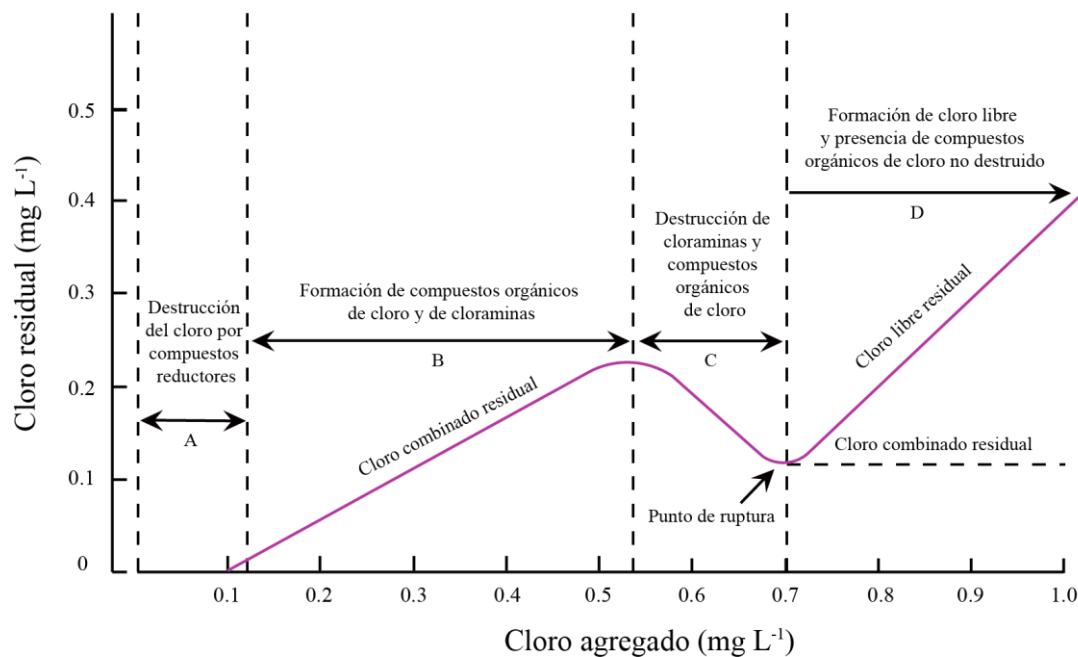
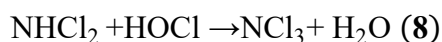
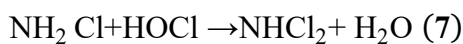
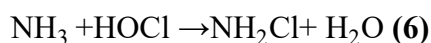


Figura 1.4. Etapas del proceso de desinfección con cloro en agua (Domínguez-Tello, 2017).

El término cloro libre hace referencia a la cantidad de cloro que se encuentra formando parte de estas tres especies (HOCl , ClO^- , Cl_2) siendo, por tanto, la cantidad de cloro potencialmente disponible para las reacciones de oxidación y desinfección. Consecuentemente, mantener un nivel de cloro libre en un rango de pH adecuado para maximizar la concentración de HOCl , y alcanzar la máxima actividad antimicrobiana es crítico y debe ser constantemente controlado (Gombas y col., 2017; López-Gálvez y col., 2019). Asimismo, se llama cloro combinado al que está formando parte de las cloraminas y otros compuestos, principalmente orgánicos, aunque también inorgánicos. Por último, el cloro total es la suma del cloro libre y el cloro combinado (**Ecuación 9**).



Cloro libre + Cloro combinado = Cloro total (9)

La principal desventaja del uso de cloro es que reacciona con la materia orgánica presente en el agua de lavado, generando subproductos de desinfección (DBPs), tales como trihalometanos (THMs) o ácidos haloacéticos (HAAs), halocetonas o cloropicrina (Nieuwenhuijsen y col., 2000; Krasner y col., 2006; Richardson y col., 2007; Gil y col., 2009). También puede generar subproductos inorgánicos, tales como clorato, formados por la descomposición del ClO^- (Agriculture and Horticulture Development Board, [AHDB], 2016). Por este motivo, la aplicación de cloro para el control de los microorganismos en producto está prohibida en ciertos países del norte de Europa, como Bélgica, Dinamarca, Alemania, Países Bajos y Suiza, debido a la formación de DBPs, aunque en Estados Unidos y en algunos países europeos como Inglaterra, Francia y España, la desinfección con cloro es una práctica habitual (Rico y col., 2007; Bao Loan y col., 2016; Simpson y Mitch, 2022). Sin embargo, en Europa la Directiva sobre las emisiones industriales (UE, 2010) incluye valores límite de emisión de una lista de sustancias contaminantes al agua que pueden verter las industrias con valores límite de emisión, incluyendo “los compuestos organohalogenados y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático”. En líneas generales, aunque la utilización del cloro como agente desinfectante está permitida, se está empezando a regular la presencia de sus subproductos, los cuales pueden ser perjudiciales para la salud de las personas y el medio ambiente.

Hipoclorito de sodio: NaOCl

Es una de las fuentes más comunes de cloro utilizadas en operaciones postcosecha. Es un potente oxidante con un amplio espectro antimicrobiano. Es relativamente barato y

se comercializa en forma líquida, incoloro y de color ligeramente amarillento, con una pureza entre el 5-12% de cloro libre. Cuando es añadido al agua de proceso, el pH sube por encima de 7.5 (Suslow, 1997; Mishra y col., 2018).

Hipoclorito de calcio: Ca(ClO)₂

Muy utilizado en las operaciones de lavado de frutas y hortalizas. Se distribuye como polvo granulado o tabletas con formulaciones entre 65-68 % de cloro libre. Si se almacena en un ambiente seco, puede permanecer estable durante largos períodos de tiempo. Tras ser añadido al agua de proceso, el pH sube por encima de 7.5. Su solubilidad en agua fría es muy baja, por lo que, si es añadido directamente al agua de proceso, los gránulos no disueltos pueden provocar daños y quemaduras en los tejidos vegetales. Para su utilización debe ser disuelto completamente en una pequeña cantidad de agua tibia antes de añadirlo al agua de lavado. Esto se puede evitar con la utilización de tabletas que se disuelven lentamente en el agua fría aportando un suministro continuo de cloro al agua, si son utilizadas adecuadamente. Asimismo, además de su poder como agente desinfectante, su utilización puede mejorar la vida útil y la resistencia a enfermedades de las frutas y las hortalizas al aportar calcio (Suslow, 1997; Mishra y col., 2018).

Cloro gas (Cl₂)

Aunque es una de las fuentes más baratas de cloro, incluso más que el NaOCl y Ca(ClO)₂, su utilización no está tan extendida debido a su potencial peligrosidad y al exigente control para su manipulación. Se comercializa como líquido comprimido, con una pureza del 100% de cloro libre y su adición reduce el pH del agua por debajo de 6.5. Se utiliza en plantas grandes, utilizando sistemas de inyección automatizados y con

sistemas para la continua monitorización del pH. En medios muy ácidos puede liberarse del agua de lavado, provocando irritación en las mucosas y el sistema respiratorio de los trabajadores. Asimismo, puede reaccionar de forma explosiva si se expone a altas temperaturas o formar compuestos explosivos con otros agentes químicos como el aguarrás o el amoníaco (Suslow, 1997; Mishra y col., 2018; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2018).

Dióxido de cloro (ClO₂)

Es un gas que se disuelve fácilmente en el agua, sin reaccionar con ella. No puede ser comprimido y almacenado bajo presión porque es explosivo, por lo que normalmente es generado “in situ”, combinando Cl₂ y NaClO₂ o combinando NaOCl, HCl y NaClO₂. Sin embargo, en los últimos años se han empezado a comercializar soluciones estables de ClO₂ que permiten su uso sin necesidad de una gran inversión inicial (López-Gálvez y col., 2017). A concentraciones por encima del 10% o temperaturas por encima de 130 °C este gas es explosivo. Su ventaja es que tiene un potencial de oxidación unas 2.5 a veces mayor al HOCl y su poder de desinfección es relativamente constante a un amplio rango de pH (entre 6.0 y 10.0, aproximadamente). Asimismo, no forma DBPs organoclorados, aunque puede formar subproductos como los iones clorato (ClO₃⁻) y clorito (ClO₂⁻). A diferencia del HOCl, que reacciona por oxidación y sustitución electrolítica, el ClO₂ reacciona sólo por oxidación, lo que explica la baja generación de subproductos organoclorados (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2000). Sin embargo, al igual que ocurría con el Cl₂, el ClO₂ es irritante de las mucosas y del sistema respiratorio, y puede ser explosivo si entra en contacto con compuestos como el amoníaco (Suslow, 1997; Gómez-López y col., 2009; Mishra y col., 2018).

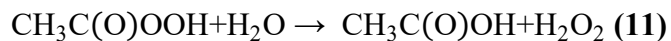
3.5.2. Ácido peracético (PAA)

El PAA es un peróxido orgánico sintetizado mediante la reacción del ácido acético y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en presencia de un catalizador como puede ser el ácido sulfúrico (**Ecuación 10**). En su forma comercial se presenta como una mezcla en equilibrio que contiene PAA, ácido acético, H_2O_2 y agua, en proporciones variables y con un pH ácido menor a 2.0 (González-Aguilar y col., 2012). El PAA es un potente agente oxidante y se comercializa en solución líquida con una pureza del 5-15%, conteniendo a menudo estabilizadores como los polifosfatos de metales alcalinos, ácido dipicolínico, o derivados. Concentraciones de PAA mayores al 15% pueden ser ligeramente inestables, reactivas o incluso explosivas (Kitis, 2004; Luukkonen y Pehkonen, 2017; Ao y col., 2021).



En formulaciones comerciales, la relación molar entre el PAA y el H_2O_2 suele ser de 0.1 a 3. El H_2O_2 es también un agente desinfectante, aunque el PAA tiene un poder antimicrobiano mayor para un amplio rango de microorganismos, necesitando el H_2O_2 dosis mayores para la inactivación (Wagner y col., 2002; Flores y col., 2014; Zhang y Huang, 2020a).

La descomposición natural del PAA puede ocurrir a temperatura ambiente, produciendo ácido acético y oxígeno. Esta reacción aumenta con la temperatura, por lo que se recomienda su almacenamiento por debajo de los 30 °C. Asimismo, el PAA es un ácido débil con un pKa de 8.2. Por encima de un pH de 8.2 se hidroliza produciendo ácido acético y H_2O_2 y perdiendo eficiencia en la desinfección (**Ecuación 11**). Esta ratio de hidrólisis aumentará con el incremento del pH (Wang y col., 2015).



Aunque el PAA es eficiente en un amplio rango de pH (1.0-8.0), presenta mayor poder biocida y un amplio espectro de efectividad a pH 4.7 (Zoellner y col., 2018). Su eficiencia en la inactivación de microorganismos se podría clasificar como: bacterias > virus > esporas bacterianas > quistes de protozoos (Baldry, 1983; Koivunen y Heinonen-Tanski, 2005; Oh y col., 2005). Asimismo, su acción antimicrobiana se relaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno, provocando daños en los lípidos, material genético y metabolitos (Zoellner y col., 2018). También provoca la desnaturalización de las proteínas, así como el incremento de la permeabilidad de la pared bacteriana, mediante la oxidación de enlaces disulfuro (Hilgren y col., 2007, Small y col., 2007; Vandekinderen y col., 2009). El PAA tiene un amplio espectro de acción, incluso en presencia de materia orgánica en el agua, presentando una gran ventaja respecto al cloro, ya que no está tan relacionado con la formación de DBPs tóxicos para la salud y el medio ambiente. La oxidación de la materia orgánica por el PAA estaría relacionada con la formación de ácidos carboxílicos, los cuales no representan toxicidad y/o mutagenicidad (Kitis, 2004; Ao y col., 2021). Sin embargo, el PAA presenta algunas desventajas frente al cloro, como su mayor costo y su menor cinética de inactivación microbiana (Van Haute y col., 2017; López-Gálvez y col., 2020). Estudios recientes han señalado que el PAA no es tan efectivo como el cloro para la degradación de contaminantes químicos y como agente biocida, ya que en lugar de producir la inactivación bacteriana puede ocasionar que las bacterias entren en un estado de baja actividad metabólica, también llamado viable pero no cultivable (VBNC) (Luongo y col., 2020; Truchado y col., 2021a). En este estado VBNC, las bacterias siguen siendo metabólicamente activas, a pesar de perder su capacidad para crecer en los medios de cultivo y formar colonias. Esto ha hecho que la

capacidad de desinfección de algunos desinfectantes como el PAA y el ClO₂, se haya sobreestimado.

3.5.3. Radiación ultravioleta (UV)

La radiación ultravioleta (UV) es una tecnología de desinfección que utiliza la radiación del espectro electromagnético con longitudes de onda (λ) comprendidas entre 100 y 400 nm, la cual puede ser subdividida en UV-C de onda corta (100-280 nm), UV-B de onda media (280-315 nm) y UV-A de onda larga (315-400nm). La radiación UV-C presenta la mayor capacidad antimicrobiana, por lo que es la utilizada en los procesos de desinfección, tanto en la industria agroalimentaria, como en otras aplicaciones, como puede ser el tratamiento terciario de las aguas residuales (Gómez-López, 2012; Rizzo y col., 2013). Dentro de la radiación UV-C, el mayor efecto biocida se produce en el rango entre 250-260 nm, debido a la mayor absorción UV por el ADN cerca de ese rango (Graça y col., 2013; Kim y col., 2013; Ali y col., 2018). Asimismo, el daño en el material genético constituye la principal acción germicida de la radiación UV, induciendo cambios fotoquímicos del ADN microbiano mediante la formación de dímeros de timina (ciclobutano pirimidina y 6-4 pirimidina-pirimidona), interrumpiendo la replicación y la transcripción del ADN y pudiendo llegar a la inactivación microbiana (Gayán y col., 2014; Deng y col., 2020). La radiación UV ha demostrado tener eficacia en la inactivación de un gran número de microorganismos, tales como virus, bacterias gram-negativa y gram-positiva, esporas bacterianas, conidios y parásitos, tanto en estudios *in vivo* e *in vitro*.

Esta tecnología se utiliza cada vez más en la industria hortofrutícola y de IV gama, ya que es económica, fácil de operar y no genera residuos que afecten a los atributos

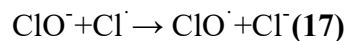
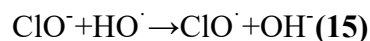
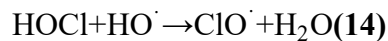
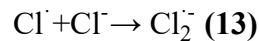
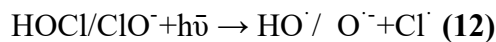
sensoriales de los productos (Allende y col., 2006; Rico y col., 2007; Ali y col., 2017). Asimismo, la acción desinfectante de la radiación UV depende de la energía incidente en la superficie aplicada, la cual es expresada comúnmente en kJ m^{-2} . Sin embargo, la optimización de la dosis exacta no es una tarea fácil en las labores de desinfección (Gómez-López, 2012). Asimismo, esta tecnología presenta ciertas desventajas, ya que la eficacia de desinfección depende de la transmitancia de la radiación en el agua de proceso por lo que, en aguas con altas concentraciones de DQO y materiales particulados y/o disueltos, la transmitancia será baja y, por tanto, también la acción antimicrobiana. Asimismo, este método de desinfección tampoco es efectivo en la inactivación de patógenos presentes en la superficie de los alimentos, ya que pueden existir zonas de sombra donde no llegue la radiación, como son las grietas e irregularidades (Simpson y Mitch, 2022).

3.5.4. Procesos de oxidación avanzada

Cloro/UV

Los procesos de desinfección mediante la aplicación simultánea de dos tecnologías como el cloro y la radiación UV, conocidas como procesos de oxidación avanzada (del inglés Advanced Oxidation Processes, AOPs) ha tenido un creciente interés en los últimos años debido a su bajo costo y alta efectividad por su acción antimicrobiana, pero también para la eliminación de la materia orgánica, microcontaminantes, incluso DBPs en las aguas, así como otras aplicaciones tales como el control del olor y sabor. Ésta es una tecnología que se utiliza, principalmente, para el tratamiento de agua de bebida, efluentes provenientes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), así como aguas residuales industriales. Sin embargo, también se utiliza durante

las etapas de procesado en la industria alimentaria. La combinación de tratamientos físicos y químicos para el lavado de productos de IV gama, aunque no está tan extendido, se muestra como una herramienta muy prometedora para la mejora de los procesos de desinfección con el fin de reducir el riesgo microbiano (Gil y col., 2009; Sisquella y col., 2013; Zoellner y col., 2018). Los espectros del HOCl y del ClO⁻ presentan diferentes máximos de absorbancia, a 237 nm y 289 nm para el HOCl y a 292 nm para el ClO⁻ (Kishimoto, 2019). Asimismo, durante los procesos de tratamiento mediante cloro/UV, se generan diversas especies reactivas con gran capacidad desinfectante. En primer lugar, se forman radicales hidroxilo ([•]OH) y radicales cloro (Cl[•]), generándose, posteriormente y mediante reacciones secundarias, otras especies reactivas del cloro (RCS), tales como Cl₂^{•-}, ClO[•] y ClOH^{•-} (**Ecuaciones 12-17**) (Yeom y col., 2021).

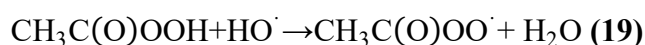
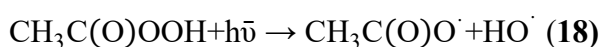


Debido a la generación de estas especies reactivas, la eficacia de los tratamientos con cloro/UV es mucho mayor que aquellos basados en la aplicación individual de radiación UV o cloración (Miklos y col., 2018). Estudios previos han demostrado el efecto sinérgico de la aplicación de ambos tratamientos de forma conjunta en la inactivación de bacterias y virus (Sharma y col., 2019 Zhang y col., 2019a). Rattanakul y col. (2014), comprobaron que la aplicación de cloro/UV tuvo una tasa de inactivación en

virus (bacteriófago MS2 y adenovirus 5) 2.3 veces mayor que la aplicación individualizada de cloro y UV en las mismas condiciones (Kishimoto, 2019). Especies como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) podrían causar la escisión de la cápside de algunos virus, permitiendo la posterior difusión del cloro, causando daño al genoma viral (Rattanakul y Oguma, 2017; Yeom y col., 2021).

PAA/UV

La aplicación del desinfectante PAA en combinación con un tratamiento físico tal como la radiación UV en forma de procesos de oxidación avanzada, aumentando la capacidad desinfectante, así como su aplicación para la eliminación de microcontaminantes, es otra tecnología cada vez más utilizada y estudiada. Las conocidas como tecnologías fotoquímicas son simples, respetuosas con el medio ambiente y relativamente rentables. Asimismo, para la activación del PAA se emplea comúnmente lámparas de mercurio de baja presión a una λ de 254 nm. La irradiación de PAA con luz UV produce la escisión del enlace O-O homolítico del PAA, dando lugar a radicales $\bullet\text{OH}$ y acetiloxilo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{O}\bullet$) (**Ecuación 18**), pudiendo a su vez reaccionar con el PAA o, incluso el ácido acético, formando radicales secundarios. El radical $\bullet\text{OH}$ puede atacar al PAA a través de una reacción de abstracción de hidrógeno, formando el radical acetilperoxilo ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OO}\bullet$). Igualmente, el PAA también puede ser atacado por el acetiloxilo $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{O}\bullet$ formando el radical ($\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OO}\bullet$) y ácido acético (**Ecuaciones 19-20**).





Además de las reacciones expuestas, la presencia de PAA, H_2O_2 y ácido acético en disolución, su fotólisis con la radiación UV, y los radicales formados durante todo el proceso desencadenan otra serie de reacciones secundarias, alguna de ellas relativamente complejas, ocurriendo de manera simultánea y formando una gran multitud de especies reactivas intermedias y finales (Rokhina y col., 2010; Zhang y Huang, 2020b; Ao y col., 2021).

En cuanto a su acción biocida, cuando la desinfección con PAA se combina con la fotólisis mediante radiación UV, la inactivación microbiana, además de la acción directa de ambas tecnologías, también se da la acción sinérgica del tratamiento combinado de PAA/UV, mediante la formación de las especies reactivas mostradas anteriormente. Rizzo y col. (2019), observaron la inactivación de formas resistentes a antibióticos de *E. coli* por la acción conjunta de PAA/UV. Asimismo, aunque estas tecnologías se encuentran en fase de estudio y desarrollo, se ha demostrado el efecto sinérgico de la inactivación bacteriana mediante la aplicación conjunta de PAA/UV, en comparación con los efectos de la aplicación de los tratamientos de forma individual (Beber de Souza y col., 2015). Hassaballah y col. (2019), observaron que el tratamiento con PAA/UV mostró una mejor eficacia en la inactivación que el PAA en este caso para colifagos somáticos, coliformes fecales y *E. coli*. Hassaballah y col. (2020), también comprobaron que el tratamiento combinado de PAA/UV alcanzó una mayor eficiencia que la sola aplicación de PAA para la inactivación de *E. coli* y *Enterococcus sp.* Asimismo, tal y como se ha mencionado, los principales radicales formados mediante el tratamiento con PAA/UV son $\bullet\text{OH}$, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{O}^\bullet$ y $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OO}^\bullet$, los cuales ejercen una efectiva acción desinfectante. El radical $\bullet\text{OH}$ puede inactivar los microorganismos mediante la destrucción de la

pared/membrana celular, induciendo la oxidación y disrupción de los lípidos, lo que produce una alteración de su estructura y permeabilidad. Esta especie muestra alta reactividad frente a muchas enzimas y puede inducir mutaciones en el material genético (Bai y col., 2018; Zoschke y col., 2014; Ao y col., 2021).

3.5.5. Parámetros de control de la desinfección

Aunque los parámetros operacionales para la desinfección del agua de proceso deben ser adaptados para cada planta y línea de proceso, dependiendo del tipo de producto, el diseño de la planta, así como el desinfectante utilizado (Tudela y col., 2019b), existen unos parámetros críticos de control en la desinfección del agua, especialmente para la desinfección con cloro y PAA (**Figura 1.5**). Asimismo, para una correcta gestión del agua de proceso en la industria hortofrutícola se deben desarrollar procedimientos operativos estandarizados, para el control eficiente de todos estos parámetros, de manera que se realice una efectiva desinfección (Gil, 2021).

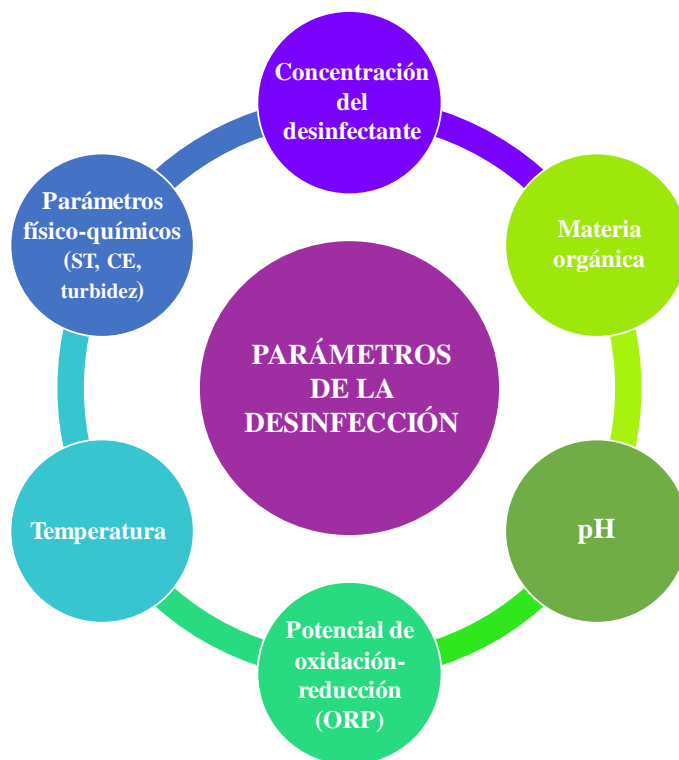


Figura 1.5. Parámetros de control de la desinfección del agua de proceso.

Concentración del desinfectante

La cantidad de desinfectante presente en el agua de lavado se consumirá progresivamente debido al consumo en las reacciones de oxidación de la materia orgánica e inorgánica, así como a otras reacciones como pueden ser la formación de las cloraminas y de los DBPs. Teniendo esto en cuenta, la concentración del desinfectante debe ser continuamente monitorizada y reajustada a través de límites operacionales, de manera que el agua de lavado tenga constantemente una adecuada concentración residual del mismo. Es necesario evitar una baja dosificación que pueda comprometer la seguridad microbiológica del lavado, pero también se debe impedir la sobredosis, que repercutirá en sobrecostos, pero sobre todo fomentará la formación de DBPs perjudiciales. La concentración residual del desinfectante es el parámetro principal y más importante que se debe tener en cuenta durante la desinfección del agua de lavado (Gombas y col., 2017).

Si el agua de proceso presenta continuamente un nivel suficiente de agente desinfectante, éste inactivará los microorganismos, evitando eficazmente la contaminación cruzada, pudiendo reducir a su vez parte de la carga microbiana de la superficie del mismo. El límite mínimo residual de desinfectante debería establecerse como aquella concentración mínima que mantiene la calidad microbiológica del agua de lavado teniendo en cuenta los límites máximos establecidos (*E. coli* < 2 log UFC/ 100 ml) (Gil, 2021).

En cuanto a la desinfección con cloro, se ha establecido concentraciones de 50–200 mg L⁻¹ de cloro libre a un pH ≤ 7.0 y con un tiempo de contacto entre 1-2 min, siendo éstas muy superiores a las que actualmente se recomiendan. Actualmente, se recomiendan límites operacionales entre 20-40 mg L⁻¹, dependiendo del tipo de producto (Tudela, y col., 2019b). Estudios previos han sugerido un límite mínimo de cloro libre entre 2.2-10 mg L⁻¹, basado en la inactivación de *E. coli* 0157:H7 en lechuga y espinaca en condiciones de laboratorio (Gómez-López y col., 2014; Luo y col., 2011; Munther y Wu, 2013). Asimismo, Tudela y col. (2019a), estableció diferentes límites operacionales según el tipo de producto y agua de proceso, atendiendo a la inactivación de bacterias aerobias totales (BAT), así como teniendo en cuenta la posible formación de DBPs (THMs, HAAs y clorato). Las concentraciones residuales de 10 mg L⁻¹ de cloro libre fueron adecuadas para cebolla picada. Sin embargo, concentraciones intermedias (20-25 mg L⁻¹ cloro libre) fueron necesarias para lechuga y col rallada, y altas concentraciones (>30 mg L⁻¹ de cloro libre) ni siquiera fueron efectivas para garantizar la seguridad microbiológica en brotes tiernos. Esto pone en evidencia la importancia del tipo de producto y cómo afecta a las características del agua para establecer los límites residuales mínimos necesarios de desinfectante. En cuanto al PAA, la Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición. (AECOSAN), estableció la mínima dosis efectiva de PAA para

evitar el riesgo microbiológico en 0.2% para el agua de lavado de tomates y 0.4% para el lavado de cítricos (AECOSAN-2016-002, 2016).

Por tanto, para llevar a cabo una correcta desinfección del agua de lavado, es necesario realizar la monitorización de las concentraciones residuales del agente desinfectante con metodologías altamente selectivas que no presenten interferencias con los compuestos presentes en el agua de proceso. Por este motivo los procesadores de productos frescos necesitan procedimientos y equipos de medición exactos, precisos y altamente selectivos, de manera que se obtengan unos resultados fiables, así como de respuesta rápida, para llevar a cabo una monitorización periódica o incluso en continuo. Los equipos deben de ser, además, sencillos de utilizar por los trabajadores y relativamente económicos. Actualmente, existen diversas metodologías para la medición de estos desinfectantes, algunas de ellas son sencillas, rápidas y pueden ser realizadas “in situ” y otras, en cambio, son más tediosas o, incluso, deben ser realizadas en un laboratorio por personal cualificado.

Por ejemplo, para medir la concentración de cloro en la industria, el método más utilizado es el método colorimétrico DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina). Otras metodologías, aunque menos frecuentes incluyen, métodos fotométricos o de valoración amperométrica (American Public Health Association, [APHA], 2014). Para la detección y análisis de PAA en soluciones acuosas, se han descrito metodologías basadas en cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Effkemann y Karst, 1998; Furia y col., 1984; Kirk y col., 1992; Pinkernell y col., 1996, 1997), así como métodos basados en valoraciones o titulaciones con permanganato, sulfato cérico o mediante método yodométrico (Gombas y col., 2017; Zoellner y col., 2018). Un método rápido para la medición del PAA consiste en la aplicación de tiras reactivas con una posterior lectura con un reflectómetro (Fischer y col., 1990). Este

método, también puede ser utilizado para la detección y cuantificación de cloro. Igualmente, los métodos cronoamperométricos, basados en la reducción electroquímica del agente desinfectante y la detección amperométrica son también utilizados, tanto para el cloro como para el PAA. Esta técnica aplica un voltaje fijo a un electrodo de un solo uso, registrando la intensidad de la corriente resultante a lo largo del tiempo, siendo esta intensidad proporcional a la concentración del agente desinfectante. Asimismo, la utilización de sondas amperométricas para la monitorización en línea del desinfectante, es una metodología capaz de monitorizar su concentración en continuo, con las ventajas que eso conlleva para llevar a cabo una correcta dosificación durante todo el proceso de lavado. La medición amperométrica utiliza un electrodo encapsulado en una solución salina y envuelto en una membrana semipermeable (Gombas y col., 2017; Zoellner y col., 2018). En líneas generales, la monitorización automática mejora el correcto mantenimiento de una concentración residual apropiada del desinfectante (Tudela y col., 2019a; 2019b; Simpson y Mitch, 2022).

Potencial de oxidación-reducción (ORP)

El potencial de oxidación-reducción (ORP), medido en mV, es el potencial al cual la oxidación ocurre en el ánodo (positivo) y la reducción ocurre en el cátodo (negativo) de una celda electroquímica (Suslow, 2004). Mediante el ORP se mide la energía química de oxidación-reducción y se convierte en energía eléctrica, utilizando para ello un electrodo de referencia y uno indicador, siendo el ORP positivo cuando se produce una oxidación y negativo cuando se produce una reducción. El ORP permite la monitorización y el registro del potencial de desinfección que tiene el agua. Algunos autores han correlacionado este parámetro con la concentración de cloro libre presente en el agua (Spahl, 2012). Sin embargo, otros defienden la falta de una correlación entre la medición

del ORP y algunos desinfectantes con poder oxidante. Por ejemplo, la medición del ORP podría no ser una metodología adecuada para la medición del potencial antimicrobiano del agua tratada con PAA o H₂O₂. Asimismo, se ha demostrado que con valores de ORP entre 650-700 mV, las bacterias tales como *E. coli O157:H7*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* o coliformes termotolerantes son inactivados en menos de 30 s (Suslow, 2004).

pH

Tal y como se ha comentado anteriormente, el pH es un parámetro crítico para la correcta desinfección con cloro, ya que en el rango entre 4-6 la especie con mayor capacidad antimicrobiana (HOCl) será la predominante (Deborde y von Gunten, 2008). Teng y col. (2018), señalaron una bajada en la eficacia del cloro conforme el pH subía. López-Gálvez y col. (2019) también observaron que la mayoría de muestras de agua de lavado de una línea de procesado (>80%) presentaban bacterias mesófilas aerobias cultivables, causado probablemente por condiciones de pH no controladas. Asimismo, se ha demostrado que el ácido utilizado para el ajuste del pH puede influir en la formación de DBPs. Fan y Sokorai (2015) observaron que la utilización de ácido cítrico como regulador de pH, en comparación con el fosfato de sodio, contribuyó en mayor medida a la formación de cloroformo (1000 vs 35 µg L⁻¹). También se ha observado que la aplicación de ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico, para la regulación del pH durante el lavado, puede contribuir al aumento de la demanda de cloro en el agua (Teng y col., 2021).

Con respecto a la desinfección con PAA, aunque este parámetro no es tan crítico, sí es cierto que en condiciones alcalinas (pH>9) éste posee una capacidad antimicrobiana

menor. Tal y como se ha comentado anteriormente, el PAA tiene un pka de 8.2, por lo que en condiciones alcalinas la especie predominante será la forma ácida disociada, que se traduce en una menor eficacia en la desinfección. Se ha demostrado que la inactivación de coliformes totales por PAA fue entre 2-3 log UFC/100 mL mayor a pH 7.0 que a pH 10.0 (Sánchez-Ruiz y col., 1995; Kitis, 2004).

Materia orgánica

La cantidad de material orgánica influye enormemente en el proceso de desinfección, ya que la oxidación de estos compuestos por parte del desinfectante, especialmente el cloro, reduce drásticamente la concentración del mismo, resultando en una menor efectividad por fluctuación de la concentración en el agua de proceso (Gil y col., 2014). Por tanto, este hecho influye enormemente en la gestión del desinfectante en las líneas de procesado, ya que la continua entrada de nuevo producto provoca el aumento de la materia orgánica y, en consecuencia, la necesidad de adicionar más desinfectante para el mantenimiento de una concentración residual adecuada. En este sentido, se ha demostrado un aumento de la eficacia de la desinfección con PAA con la disminución de la DBO, por lo que la monitorización de la materia orgánica a través de parámetros como la DQO y la DBO durante la desinfección sería recomendable (Kitis, 2004). Otro parámetro para la medición de la materia orgánica presente en el agua de lavado sería la medida del carbono orgánico total (COT), donde los compuestos que contienen carbono son transformados en dióxido de carbono y posteriormente detectados fotométricamente con la ayuda de una solución indicadora. Igualmente, la medición del coeficiente de absorción a una longitud de onda de 254nm (UV₂₅₄) es otra medida que se ha correlacionado con la carga orgánica de agua de lavado (Ramos-Ascue, 2018). Chen y

Hung (2016), obtuvieron una fuerte correlación entre la UV_{254} y la demanda de cloro. Sin embargo, el PAA al ser un ácido orgánico, su presencia en el agua aumenta la carga orgánica, interfiriendo en la monitorización (Gil, 2021).

Asimismo, tal como se ha mencionado anteriormente (3.3. *Características de las aguas residuales de la industria hortofrutícola*), el tipo de producto y de procesado determinan la cantidad y el tipo de materia orgánica presente en el agua de lavado, influyendo enormemente en la demanda de cloro. Los exudados derivados del procesado de las frutas y hortalizas pueden incrementar considerablemente la DQO del agua de lavado, siendo éstos vulnerables al ataque electrofílico del cloro libre, aumentando la demanda de cloro del agua de lavado. Teng y col. (2021) estudiaron la demanda de cloro en el agua de lavado de diferentes productos frescos cortados, en función del tiempo de cloración y de la composición del agua de lavado. Estos autores observaron diferencias en la demanda de cloro en función de la composición del agua de lavado, principalmente de compuestos como azúcares, proteínas, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, entre otros, en función del producto estudiado y a la distinta reactividad de los grupos funcionales de estos compuestos con el cloro. Se observó una gran demanda de desinfectante en los primeros 5 min de cloración, consumiendo el 50% del cloro total en ese tiempo, seguido de un aumento sostenido en las siguientes 2 horas. El rápido consumo de desinfectante en las primeras etapas de la cloración podría ser debido a la presencia de compuestos altamente reactivos, como aminoácidos libres, compuestos fenólicos con ciertos grupos de sustitución y compuestos sulfurosos como algunas proteínas con el aminoácido cisteína (Weng y col., 2016). Asimismo, López-Gálvez y col. (2019) analizaron el cloro libre residual de una planta procesadora, el cual se mantuvo durante 5 horas en concentraciones de 50-70 mg L⁻¹ en el lavado de brotes tiernos y con una DQO máxima de 110 mg L⁻¹. En cambio, las concentraciones de cloro libre fluctuaron en 3

horas entre 40-250 mg L⁻¹ en el lavado de zanahoria, col y tomates rallados con una DQO máxima de 7000 mg L⁻¹.

Temperatura

En cuanto a la temperatura del agua de lavado, se ha descrito que la actividad antimicrobiana aumenta con el aumento de la temperatura. Asimismo, durante la desinfección con cloro, a medida que aumenta la temperatura, también lo hace la tasa de volatilización del Cl₂, pudiéndose liberar a la atmósfera (Suslow, 1997). En cuanto al PAA, aunque éste funciona bajo un amplio rango de temperatura, el aumento de la misma también favorecerá su actividad desinfectante, aunque un aumento por encima de los 30 °C provocará la descomposición del PAA (Stampi y col., 2001; Kitis, 2004; Wang y col., 2015; Ao y col., 2021).

Sin embargo, el ajuste de la temperatura para el aumento de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes no es algo que se haga, ya que la temperatura del agua de lavado de las líneas de procesado es <10 °C ya que sirve para enfriar el producto, reducir la respuesta al daño por el corte y el deterioro y aumentar así la vida útil (Zagory, 1999; Simpson y Mitch, 2022).

Otros parámetros físico-químicos

De manera general, los parámetros como los sólidos totales (ST), los sólidos disueltos (SDT) y los sólidos en suspensión (SST) deber ser monitorizados, ya que ayudan a la caracterización de la calidad del agua de lavado y por tanto al proceso de desinfección (Gil y col., 2009). Asimismo, otros parámetros a tener en cuenta consisten en la

determinación de la conductividad eléctrica (CE), correlacionada con la concentración de los SDT (Thirumalini y Joseph, 2009) o de la turbidez, mostrando el grado de transparencia del agua, la cual está correlacionada con la materia particulada o SST (Van Haute y col., 2015) y expresada mediante unidades nefelométricas de turbidez (UNT). En general, se observa un aumento de la eficacia de la desinfección con PAA, con la disminución de los SST. Sin embargo, Lefevre y col. (1992) alcanzaron una buena desinfección con niveles de SST superiores a 100 mg L⁻¹. Otros autores también observaron una disminución de la actividad antimicrobiana con el aumento de la turbidez de 2 a 10 UNT (Rajala-Mustonen y col., 1997; Kitis, 2004). Igualmente, la profundidad de penetración de la radiación UV-C en agua de lavado disminuye progresivamente con el aumento de ciclos de lavado en el agua de proceso, debido al incremento de partículas en suspensión (Ignat y col., 2014; Manzocco y col., 2015). Medidas como la filtración para eliminar la materia particulada, la renovación periódica del agua de lavado y el prelavado de los productos pueden disminuir los sólidos totales del agua de lavado, disminuyendo la cantidad de desinfectante aplicado para mantener una concentración residual efectiva, mejorando el proceso de desinfección (Suslow, 1997).

3.6. Reciclado del agua de proceso

La reutilización y recirculación del agua en la etapa de lavado, a través de una correcta desinfección, reduce drásticamente el consumo de agua durante el procesado de las frutas y hortalizas. Asimismo, se podría incorporar la reutilización del agua en aquella etapa donde la calidad requerida sea menor. Para ello, se recomienda que el flujo de agua vaya en dirección opuesta al avance del producto (Gil y col., 2009). Por ejemplo, el agua del tanque de lavado podría recircularse para su utilización en el prelavado. Asimismo, el

agua del aclarado podría incorporarse al tanque de lavado, y esta última reutilizada en la etapa de prelavado, en un proceso continuo. Igualmente, el agua del enjuague también podría utilizarse para la limpieza de las materias primas en el área de recepción (**Figura 1.6**). La implementación de estos sistemas podría contribuir al ahorro de hasta un 30% del agua consumida (Manzocco y col., 2015). Si la recirculación y la reutilización de las aguas de proceso se lleva a cabo, repercutirá efectivamente en un descenso en el consumo de agua y en la generación de aguas residuales. Sin embargo, aun implementando estas prácticas e incluso con una correcta gestión de la desinfección del agua de proceso, los diferentes tanques de lavado deben vaciarse periódicamente, a fin de mantener con mayor seguridad la calidad microbiológica del agua de proceso y garantizar la calidad de los productos lavados. Por este motivo, tanto el consumo de agua como la generación de aguas residuales seguiría siendo elevada.



Figura 1.6. Flujo del producto y posible gestión eficiente del agua durante el procesado de frutas y hortalizas (Gil y col., 2009; Manzocco, 2015).

Para alcanzar una mayor eficiencia en la gestión del agua, la incorporación de tratamientos de depuración y reutilización de las aguas de proceso podría ser una solución adecuada. Sin embargo, la implantación de las instalaciones destinadas al tratamiento de las aguas requiere generalmente de grandes inversiones. Asimismo, tal y como se ha comentado anteriormente, el Real Decreto de reutilización de aguas depuradas establece la posibilidad de utilización de las aguas regeneradas para agua de proceso y limpieza en la industria alimentaria (BOE, 2007b). Como ejemplo, una industria de IV gama de gran tamaño podría conseguir ahorrar hasta el 90% del total del agua consumida si recicla el total del agua invertida en las etapas de lavado (Manzocco y col., 2015). Sin embargo, aunque ésta es una opción posible, la obtención de aguas regeneradas con una calidad y seguridad microbiológica suficiente para su reutilización como agua de proceso es una

tarea costosa y complicada, por lo que, si estas aguas son reutilizadas en la industria, suelen estar destinadas a la limpieza de las instalaciones u otro tipo de procesos que no implique contacto directo con el producto. Uno de los desafíos más importantes para el tratamiento de estas aguas residuales es garantizar los estándares necesarios, de manera que se garantice la seguridad y calidad de las frutas y hortalizas (Casani y col., 2005; Meneses y col., 2017; Shrivastava y col., 2022). Asimismo, cada tipo de industria alimentaria posee unas características diferentes en cuanto a las aguas residuales generadas y, por tanto, difiere las etapas y tecnologías de tratamiento de las mismas. De manera general, los sistemas de tratamiento de las aguas residuales se clasifican en tratamientos primarios (físico-químicos), secundarios (biológicos) y terciarios (incluyendo desinfección). Estos tratamientos se describen posteriormente (*5.1. Etapas de tratamiento de las aguas residuales en una EDAR*) y, aunque la descripción realizada se engloba dentro de los procesos de tratamiento de aguas en una EDAR, podrían ser coincidentes con las aplicadas en la industria alimentaria, en particular en la industria hortofrutícola (Isosaari y col., 2010; Lehto, 2019; Bueno y col., 2020).

4. REUTILIZACIÓN DE LAS AGUAS EN LA INDUSTRIA DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNA VEGETAL

El cambio en el estilo de vida de la población, cada vez más preocupada por seguir unos hábitos de consumo saludables, así como el aumento de la conciencia por el consumo de alimentos más sostenibles y de menor impacto para el medio ambiente ha despertado el interés por la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas derivadas de plantas, como forma alternativa a la proteína de origen animal (Houde y col., 2018). Asimismo, desde una perspectiva ambiental, existe una gran diferencia entre los volúmenes requeridos de agua para la producción de carne y la de productos vegetales. La FAO

estima que se necesitan alrededor de 5.000-20.000 L de agua para producir 1kg de carne, en comparación con los 500-4000 L para 1 kg de un cereal, como el centeno (Fundación Aquae, 2022). La transición hacia el suministro de proteínas de origen vegetal resultaría en una producción alimentaria más sostenible (Alexandratos y Bruinsma, 2012; Roos y col., 2016). Todo ello ha contribuido a la creciente utilización y desarrollo de proteínas de origen vegetal. Las proteínas vegetales contienen cantidades suficientes de aminoácidos esenciales y se utilizan a menudo como suplementos proteicos (Day, 2013; Assatory y col., 2019). Dentro de ello, las legumbres se consideran una fuente importante de proteínas con un contenido alrededor del 17-30% en peso seco, conteniendo altas cantidades de lisina, leucina, ácido aspártico, glutámico y arginina. Para la extracción de la proteína vegetal, las legumbres pueden ser procesadas para la obtención de harina mediante la molienda de las semillas, alcanzando una concentración de proteína alrededor del 25%. También se puede obtener un concentrado de proteína mediante el procesado de la harina en fraccionamiento por flujo de aire, llegando en este caso alrededor del 50% de proteína. Por último, el aislado, con alrededor del 85% de proteína, se somete a un procesamiento húmedo, en condiciones alcalinas o ácidas (Boye y col., 2010a; Barac y col., 2015).

4.1. El haba (*Vicia faba*) y el guisante (*Pisum sativum*) como fuente de proteína vegetal

Las habas (*Vicia faba*) y los guisantes (*Pisum sativum*) son dos legumbres ampliamente utilizadas para la extracción de proteínas de origen vegetal (Boye y col., 2010a, 2010b; Millar y col., 2019; Lie-Piang y col., 2021). Las composiciones químicas de las habas y los guisantes pueden variar atendiendo a la variedad, la madurez y las condiciones de crecimiento de las plantas. Sin embargo, de forma general, las habas

contienen alrededor del 29.3% de proteína, 65.5% de carbohidratos y 1.7% de grasa. Asimismo, más del 80% del contenido proteico consiste en globulinas de almacenamiento, tales como vicilina y legumina (Warsame y col., 2018). En cuanto a los guisantes, éstos contienen alrededor del 25.6% de proteína, 68.4% de carbohidratos y 1.9% de lípidos (Schutyser y van der Goot, 2011). Casi todo el contenido proteico está formado por globulinas y albúminas, representando el 18-25% y el 55-65%, respectivamente, siendo todas las globulinas (convicilina, vicilina y legumina) y algunas de las albúminas, proteínas de almacenamiento utilizadas como fuente de nitrógeno después de la germinación de la semilla (Tsoukala y col., 2006; Tzitzikas y col., 2006; Barac y col., 2015).

Las habas y los guisantes contienen una pequeña proporción de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos, así como vitaminas y minerales (Turco y col., 2016; Lam y col., 2018). El perfil de aminoácidos, así como sus cantidades relativas, son similares en habas y guisantes. Tanto la harina de haba como la de guisante presentan cantidades similares de zinc, magnesio, calcio, hierro y potasio. Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, estando presentes en los alimentos de origen vegetal (Amarowicz y Pegg, 2008; Baginsky y col., 2013). Son bien reconocidos por sus propiedades antioxidantes, así como por su contribución a la prevención de diversas enfermedades humanas como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes, y enfermedades neurodegenerativas (Cassano y col., 2018). Diversos estudios han descrito el contenido en polifenoles de las harinas de haba y guisante, siendo este contenido y la actividad antioxidante mayor en la harina de haba (Millar y col., 2019). Baginsky y col. (2013), identificaron diferentes procianidinas, prodelfinidinas, flavonoles y flavanonas en diversas variedades de semillas inmaduras de haba, además de más de 100 compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y ácidos

fenólicos (Abu-Reidah y col., 2014; Turco y col., 2016). En cuanto al guisante, se han identificado un total de 115 compuestos fenólicos, siendo los flavonoides el grupo mayoritario (flavonoles glicosilados, flavonas, flavanoles, flavanonas, antocianinas, isoflavonoides y pterocarpanos) seguido por los ácidos fenólicos (incluidos los derivados del ácido benzoico y ácido hidroxicinámico) (Fahim y col., 2019).

4.2. Procesado y extracción de la proteína vegetal

Para la extracción de la proteína vegetal, en primer lugar, se realiza la molienda de las semillas para la reducción del tamaño del grano y la obtención de la harina. Diferentes metodologías son utilizadas para este proceso: molienda por impacto con molinos de martillo para granos gruesos, legumbres y especias, fresado por desgaste reduciendo el tamaño de partícula por el cizallamiento de un rotor con forma de jaula, molienda de pasadores mediante el impacto contra un disco de pasadores giratorio, o fresado por chorro acelerando las partículas en una corriente de aire o gas de alta velocidad y reduciendo el tamaño por colisiones con otras partículas o las paredes del molino (Assatory y col., 2019).

Esta harina se puede utilizar para obtener concentrados o aislados de proteína. Generalmente, los concentrados se obtienen mediante un fraccionamiento por flujo de aire de la harina, siendo éste un método de procesado en seco que separa los gránulos de almidón, más ligeros, de la proteína (Barac y col., 2015). En este proceso, las partículas de polvo se separan según sus propiedades aerodinámicas, atendiendo a su densidad y tamaño, estableciendo un tamaño de corte para su separación. Por tanto, la harina queda dividida en dos fracciones: una fracción gruesa con partículas de tamaños por encima del tamaño de corte, y una fracción fina (Schutyser y van der Goot, 2011). Seguidamente,

para la obtención de los aislados proteicos se realiza una extracción acuosa a pH alcalino seguida de una precipitación isoelectrica de las proteínas. Esta técnica utiliza la alta solubilidad de las proteínas de las legumbres a un pH alcalino y la baja solubilidad de éstas a un pH cercano a su punto isoelectrico (pH 4.0-5.0). De forma general, la harina se disuelve en agua y se ajusta el pH de la disolución (pH 7.0-8.0). La mezcla se deja reposar (30-180 min), mientras el pH se mantiene en el valor deseado, pudiéndose elevar la temperatura para aumentar la solubilidad de las proteínas. Posteriormente, esta mezcla se filtra para eliminar cualquier compuesto insoluble y el pH del extracto se ajusta al punto isoelectrico para inducir su precipitación. El extracto se centrifuga para recuperar la proteína, y posteriormente se realiza un lavado del precipitado para eliminar las sales e impurezas, para finalizar con la neutralización y el secado. Aunque menos frecuente, también se puede realizar el aislado de la proteína mediante una extracción ácida. El principio de la extracción ácida es similar a la alcalina, sólo que la extracción de proteína inicial se lleva a cabo en condiciones ácidas. Esto es debido a que la solubilidad de las proteínas de las legumbres también es alta a pH bajos (pH<4.0), por tanto, se pueden utilizar rangos de pH ácidos para solubilizar las proteínas antes de su precipitación en su punto isoelectrico. El contenido proteico de las fracciones obtenidas puede ser variable debido a las diferencias en las condiciones de procesado. Asimismo, la ultrafiltración (UF) con membrana es utilizado frecuentemente como alternativa a la precipitación isoelectrica. La utilización de la UF aumenta el rendimiento de los aislados proteicos, y puede cambiar ligeramente su composición. Estudios previos demostraron que de un aislado de proteína de haba (*Vicia faba equina* L. cv. Diana) y de guisantes (*Pisum sativum* L. cv. Trapper) se puede obtener un contenido proteico de 94.1% y 89.5%, respectivamente (Vose, 1980; Boye y col., 2010a).

4.3. Consumo y características de las aguas provenientes de la extracción de proteína vegetal

Los procesos industriales que producen aislados de proteínas a gran escala consumen agua en grandes cantidades, generando a su vez altos volúmenes de aguas residuales de naturaleza ácida y conteniendo material proteico y otros compuestos orgánicos provenientes de las harinas. Este gran consumo de agua, pero también de energía, es debido a las grandes diluciones usadas para separar los distintos constituyentes, así como la energía requerida para eliminar el agua del producto final (Schutyser y van der Goot, 2011; Mondor y col., 2012; Assatory y col., 2019). Concretamente, durante los pasos necesarios para la extracción húmeda de proteína se utilizará una gran cantidad de agua para la disolución inicial de la harina, así como para el lavado final del extracto proteico. La cantidad exacta de agua utilizada es variable y depende de la optimización de los parámetros de cada proceso, pero en términos generales, la relación entre materia prima y agua varía en una ratio alrededor de 1:5-1:20 (Boye y col., 2010a). Lie-Piang y col. (2021), establecieron consumos de agua de 10-20 m³ para la extracción de proteína vegetal por cada 1000 kg de guisantes y altramuces cultivados. Asimismo, Colantoni y col. (2017), en su análisis del ciclo de vida (ACV) indicaron un consumo de agua de 11 kg por cada kg de hidrolizado proteico producido a partir de altramuces. La cantidad de aguas residuales generadas irá en consonancia con los grandes volúmenes de agua consumidos. Se han descrito emisiones de 20 toneladas de aguas residuales para la producción de 1 tonelada de proteína de soja (Chen y col., 2019). Aunque no existen muchos estudios sobre la caracterización de estas aguas residuales, es de esperar que tengan unos parámetros similares al resto de las aguas residuales provenientes de la industria alimentaria, con una carga orgánica alta, mostrando niveles de DQO y DBO altos (Asgharnejad y col., 2021). También sería

necesario el estudio de otros parámetros como los ST o incluso la turbidez, el pH o la CE. En la industria de la soja, las aguas residuales presentan altos niveles de DQO (>16000 mg L⁻¹), ST (18200 mg L⁻¹) y SST (4000 mg L⁻¹). Asimismo, estas aguas residuales pueden contener altas cantidades de nutrientes de alto valor añadido y compuestos bioactivos como proteínas, ácidos grasos insaturados, fibras dietéticas y polifenoles. Las aguas residuales de la extracción de proteína de soja mostraron altas concentraciones de proteínas (4000 mg L⁻¹), isoflavonas (100 mg L⁻¹) y oligosacáridos.

Es evidente el valor potencial de las aguas residuales provenientes de la extracción de proteína vegetal. La pérdida de nutrientes de valor añadido en este tipo de aguas residuales es un problema en este tipo de industrias y para abordarlo es necesario investigar en tecnologías para la recuperación de los mismos, asegurando a su vez la seguridad alimentaria, tanto microbiológica como química, teniendo en cuenta la legislación vigente, así como factores como el coste de las tecnologías implementadas y la satisfacción de la empresa. La recuperación de los compuestos bioactivos para posteriormente desarrollar productos de alto valor añadido contribuiría a la optimización del proceso, así como a la reducción del impacto medioambiental (Chen y col., 2019). Además, para la reutilización de estas aguas, sería necesaria la monitorización y gestión de los compuestos de alto valor añadido recuperados, además de garantizar la seguridad microbiológica y la ausencia de agentes químicos tóxicos. Tal y como se ha mencionado anteriormente, en este caso también se puede establecer un programa de APPCC, para identificar, evaluar y controlar los peligros, garantizando la inocuidad de los mismos (CAC, 1969). Sin embargo, no se ha desarrollado una herramienta específica para evaluar los peligros y establecer un sistema de control en la reutilización de nutrientes recuperados de las aguas residuales (Chen y col., 2019). Por otra parte, tras la recuperación de estos compuestos bioactivos, sería necesario la implementación de

tecnologías para el tratamiento, reutilización y/o reciclaje de estas aguas residuales. Estas tecnologías deberían mejorar las características físico-químicas, al mismo tiempo que previenen el crecimiento de organismos patógenos y/o causantes de degradación. También sería necesaria la integración de los procesos de reutilización de estas aguas en el sistema de APPC, incluyendo la identificación de los peligros y el establecimiento de procedimientos de seguimiento y verificación (Casani y Knøchel, 2002). Recientemente, Chen y col. (2019), describieron la aplicación de diferentes tecnologías para la recuperación de sustancias bioactivas en aguas residuales. Los métodos físicos basados en tecnologías de separación por membranas se han aplicado previamente para el reciclaje de agua y la recuperación de los subproductos de alto valor añadido presentes en las aguas residuales (Casani y col., 2005), permitiendo el posterior vertido seguro de estas aguas. Las membranas de ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF) se han utilizado para recuperar compuestos bioactivos de las aguas residuales generadas por la industria agroalimentaria (Cassano y col., 2018). Sin embargo, estos métodos tienen ciertas limitaciones, ya que las aguas emitidas por las diferentes industrias son variables y, por lo tanto, las tecnologías de recuperación deben adaptarse a cada condición específica.

5. UTILIZACIÓN DE AGUAS REGENERADAS EN AGRICULTURA

La industria agrícola es una de las que más agua consume, variando la cantidad de agua necesaria en función de la región y el clima, el tipo y modo de cultivo (secano o regadío), variedad, duración del ciclo del cultivo y del rendimiento (De Fraiture y Wichelns, 2010). Sin embargo, en términos generales y a nivel global, la agricultura puede llegar a representar hasta el 70% de todas las extracciones de agua e incluso alcanzar el 95% en algunos países en vías de desarrollo (Rost y col., 2008; FAO, 2019;

Hossain y col., 2021). Teniendo esto en cuenta, es necesario tener presente la huella hídrica de la producción de distintos tipos de cultivos. El arroz es el cereal que más agua consume, necesitando alrededor de 1700 L de agua para producir medio kg. El trigo o las lentejas requieren consumos menores, necesitando para la producción de medio kg 500 y 25 L, respectivamente. Igualmente, para producir una única manzana se requieren 70 L de agua, y 5 L en el caso de una naranja (Fundación Aquae, 2022). Asimismo, el 28% de las tierras de cultivo en el mundo están ubicadas en zonas con alto estrés hídrico (40-80%) o extremadamente alto (>80%). En este contexto, el tratamiento y la reutilización de las aguas residuales urbanas para el riego puede constituir una valiosa fuente en regiones áridas y semiáridas que se enfrentan a una escasez de agua cada vez más creciente. En España existe una importante demanda de agua para la producción agrícola, alrededor de 24.094 hm³/año. Además, la distribución irregular de los recursos hídricos provoca situaciones deficitarias y de escasez de agua en una parte importante del territorio. Por estos motivos, la utilización de agua regenerada proveniente de EDARs se ha convertido en una de las fuentes de agua no convencionales más importantes e incluso menos costosas para la utilización en la agricultura (Intriago y col., 2018). Es en la costa mediterránea y en las Islas Canarias y Baleares donde principalmente utilizan las aguas residuales regeneradas para la agricultura, reutilizando las zonas de Valencia y Murcia el 57% del total de las aguas residuales depuradas en España, y en las islas el 23%. En Murcia, los recursos hídricos de la Cuenca hidrográfica del Segura no son suficientes para cubrir la alta demanda de agua, por lo que la reutilización de las aguas residuales para el riego en la agricultura resulta especialmente importante (Pedrero y col., 2010). La utilización de las aguas residuales para el riego tiene importantes ventajas, principalmente para el ahorro de agua destinado a este uso, pero también por la disminución de los

vertidos de las aguas residuales al medio ambiente (Alcalde-Sanz y Gawlik, 2017; Donnaz, 2020; UE, 2020b).

5.1. Etapas de tratamiento de las aguas residuales en una EDAR

Las aguas residuales que llegan a una EDAR, tanto de origen doméstico, urbano o industrial, se pueden someten a diferentes procedimientos estandarizados (ISO, 2020), que van a depender del tamaño de la depuradora, las características de las aguas residuales recibidas, así como el destino final. Dentro de los procesos generales que se realizan en una EDAR es necesario distinguir la línea de tratamiento de agua, que corresponde al flujo continuo de influente que entra a la depuradora y pasa por los diferentes procesos y los tratamientos destinados a la eliminación de la materia orgánica, inorgánica y los posibles microorganismos patógenos presentes, dando como resultado el agua tratada final. Sin embargo, durante el tratamiento de estas aguas se separarán una serie de residuos, destacando la producción de fangos o lodos. Éstos pueden ser primarios como materia sedimentable que ha podido ser separada por decantación, secundarios como resultado del tratamiento biológico, e incluso derivados de los tratamientos terciarios. Éstos pasan a la línea de fangos donde se espesan, estabilizan, acondicionan, deshidratan y secan, previo a su vertido y/o reutilización (**Figura 1.7**) (Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020). Seguidamente se describen las principales etapas de tratamiento de la línea de aguas:

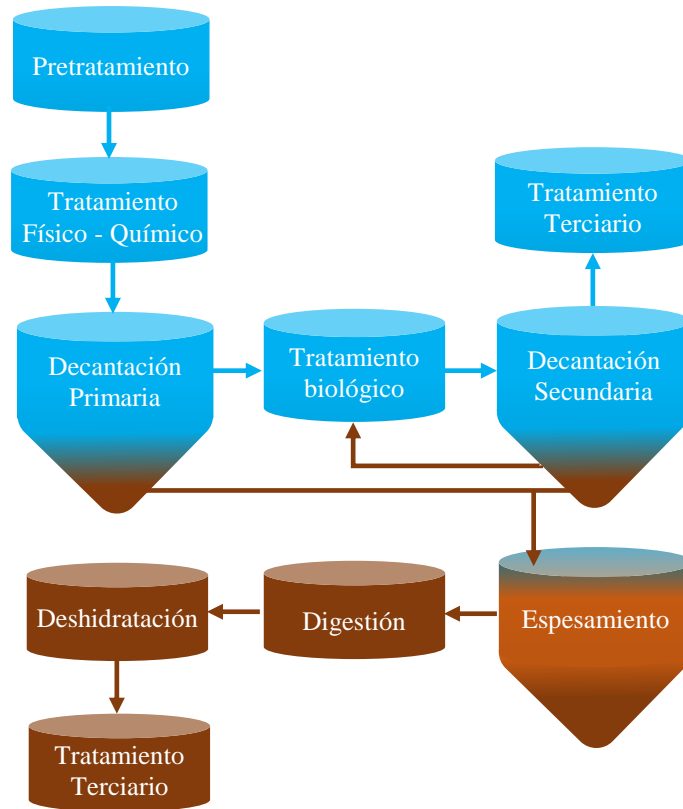


Figura 1.7. Líneas de agua y de fangos en una Estación Depuradora de Aguas Residuales.

5.1.1 Pretratamiento

En esta etapa, el agua se somete a procesos físicos con el objetivo de eliminar la materia fácilmente separable, de manera que se acondicione para facilitar la efectividad de las etapas posteriores. Estas operaciones pueden consistir en un desbaste, con la utilización de rejillas de poros gruesos (tamaño de poro entre 20-60 mm) o finos (tamaño de poro entre 6-12 mm), la utilización de tamices (partículas < 6mm) o de tamices rotatorios (partículas 0.2 -2.0 mm). Seguidamente se realizan operaciones de desarenado (para la retirada de grava, arena...etc) y desengrasado (para la limpieza de grasas y otros materiales flotantes). De forma general, se producirá la deposición de las arenas y la flotación de las grasas, favoreciendo la efectiva limpieza de ambos compuestos de las aguas residuales (Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020).

5.1.2 Tratamiento primario

Su finalidad es la reducción de la cantidad de la materia en suspensión, consiguiendo reducciones de hasta el 60%, así como la eliminación de hasta un 30% de la materia orgánica de entrada. Se utilizan distintos tratamientos físico-químicos, como la sedimentación, flotación, coagulación-floculación y filtración. Mediante la decantación primaria, los sólidos en suspensión sedimentarán por gravedad, depositándose en el fondo del sedimentador, siendo arrastrados mediante rasquetas y constituyendo el fango primario. Mediante la flotación por aire, la materia sólida y/o líquida de menor densidad asciende a la superficie, donde es arrastrada y sacada del sistema. Parte de la carga contaminante de las aguas residuales forman suspensiones coloidales, no pudiendo ser eliminada por sedimentación. En estos casos, se realizan procedimientos de coagulación-floculación, mediante la adición de sales de aluminio o de hierro junto con polielectrolitos orgánicos. De esta forma se neutralizan las cargas del coloide, favoreciendo la formación de pequeños aglomerados que posteriormente se moverán suavemente, facilitando la formación de aglomerados mayores de más fácil sedimentación (Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020).

5.1.3 Tratamiento secundario o biológico

En este proceso se produce la eliminación de la materia orgánica biodegradable, mediante la utilización de microorganismos que consumen esta materia a través de sus procesos metabólicos, generando productos finales de su metabolismo como dióxido de carbono, agua y metano, que variarán en función de si se realiza un tratamiento aerobio o anaerobio, a la vez que se incrementa la población microbiana.

Las tecnologías para estos tratamientos son muy diversas, destacando los sistemas de aireación prolongada, donde se produce una oxidación biológica seguida de una decantación secundaria. El efluente del tratamiento biológico o “licor mezcla”, pasa al decantador secundario donde sedimentan los fangos activos, con su posterior recirculación al tanque biológico para el mantenimiento de la concentración de microorganismos en el mismo, realizando periódicamente una purga o extracción de los fangos en exceso. La utilización de reactores secuenciales es una variante a los sistemas de aireación prolongada en el que todos los procesos se producen en el mismo reactor en diferentes etapas separadas en el tiempo. Otras tecnologías emplean biorreactores de membrana que combinan el tratamiento biológico con la filtración por membrana. También existen sistemas aerobios más sencillos, como los lechos bacterianos en el que el agua atraviesa una superficie cubierta por microorganismos formando una biopelícula, seguido de una decantación secundaria. Entre las tecnologías para tratamientos anaerobios destacan los reactores anaerobios con flujo ascendente, donde el agua entra por la parte inferior o en sentido ascendente a la zona donde se lleva a cabo la digestión, saliendo por la parte de arriba el agua tratada y el biogás. Otras tecnologías para el tratamiento biológico, aunque menos efectivas consisten en tecnologías extensivas como lagunajes, humedales, y filtros de arena, entre otras (Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020). Asimismo, algunas EDARs emplean tecnologías novedosas como los reactores de biofiltro electroactivo, donde el agua percola a través de un material electroconductor, colonizado por microorganismos formando una biopelícula. Éstos oxidan la materia orgánica y los electrones generados en su metabolismo son transferidos, favoreciendo las reacciones de oxidación-reducción de las distintas comunidades microbianas.

5.1.4. Tratamiento terciario

Durante este tratamiento se aplican diversas operaciones para eliminar la carga orgánica residual y otras sustancias no eliminadas durante los tratamientos anteriores, como restos de sólidos en suspensión, coloides, nutrientes como fósforo o nitrógeno, metales, sales orgánicas o microorganismos patógenos. Las aguas que llegan a este tratamiento también pueden contener contaminantes no convencionales como compuestos orgánicos refractarios o recalcitrantes o, incluso contaminantes emergentes como fármacos, plastificantes, pesticidas, subproductos de degradación de detergentes o compuestos catalogados como disruptores endocrinos (Warsinger y col., 2018). Existe una gran diversidad de tratamientos terciarios, que pueden aplicarse de forma individual o combinados entre sí, y que variarán en función de las características de la planta de tratamiento, así como del uso final de las aguas residuales regeneradas. Éstos pueden ser de naturaleza biológica, aunque la gran mayoría consisten en tratamientos físico-químicos. Entre otros se incluyen procesos de coagulación-floculación, así como la decantación lamelar, donde las partículas en suspensión se decantarán superponiendo diferentes planos de decantación, aumentando la capacidad de clarificación del agua, con respecto a los decantadores tradicionales. Asimismo, también son utilizados procedimientos de filtración con el paso del agua a través de un medio poroso, como un lecho de arena.

Existen otros procedimientos más selectivos para la eliminación de restos de materia particulada y disuelta, olores e incluso metales pesados, contaminantes emergentes o sales disueltas. Éstos se podrán realizar dependiendo del uso final del agua regenerada, ya que, para llevarlos a cabo con la efectividad adecuada, se deberá partir de un efluente suficientemente tratado y clarificado. Entre ellos destacan la utilización de resinas de intercambio iónico o catiónico o procesos de adsorción con carbón activo

(Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020). Este último sistema es capaz de eliminar compuestos orgánicos solubles y metales pesados mediante su forma de carbón activo granular (con partículas de diámetro > 0.1 mm), o carbón activo en polvo (con partículas de diámetro < 0.074 mm).

Asimismo, las tecnologías de membrana son procesos de separación física, los cuales separan selectivamente diferentes compuestos provenientes de una solución inicial. Estas tecnologías tienen grandes aplicaciones para la separación de macro y micromoléculas, iones disueltos, compuestos de valor añadido e incluso microorganismos patógenos (Shrivastava y col., 2022). Cuando la solución pasa a través de una membrana semipermeable, ésta se divide en una fracción de permeado, que contiene todos los componentes que han pasado a través de la membrana, y una fracción de rechazo, formada por aquellos compuestos que no han pasado, disueltos en algún resto de solvente (Van der Bruggen y col., 2003; Moura-Bernardes, 2014). La separación de los compuestos está determinada por el tamaño de poro de la membrana, el cual está principalmente relacionado con el punto de corte atendiendo al peso molecular, es decir la masa molecular promedio más pequeña de un soluto que no difundirá a través de la membrana. La forma, carga e hidrofobicidad de los compuestos también condicionará, aunque en menor medida, su separación a través de la membrana (Strathmann, 2001; Cassano y col., 2018). En este sentido, los procesos de membrana se pueden clasificar en diferentes categorías atendiendo a criterios como la configuración de la membrana, el tipo de material, el mecanismo de separación, la fuerza impulsora y el tamaño de los constituyentes separados. En la filtración por membrana, existen cuatro procesos principales que se clasifican según el orden decreciente de tamaño de poro teniendo en cuenta que, a medida que decrece el tamaño de poro, el proceso de separación necesita una fuerza impulsora mayor (microfiltración $>$ ultrafiltración $>$ nanofiltración $>$ ósmosis

inversa). La microfiltración y la ultrafiltración se clasifican como procesos de baja presión (< 2-7 bar), distinguiendo el tamaño de poro aproximado de ambas tecnologías en microfiltración (tamaño de poro alrededor de 0.1-1.0 μm) y ultrafiltración (tamaño de poro alrededor de 0.01-0.1 μm). En cambio, la nanofiltración con tamaño de poro alrededor de 1-10 nm, requiere presiones de hasta 25 bar (Cassano y col., 2018). En el caso de la ósmosis inversa (tamaño de poro alrededor <1 nm) la presión necesaria para impulsar el solvente a través de la membrana deberá ser superior a la presión osmótica de la disolución, llegando incluso a los 100 bar (Hamingerova y col., 2015; Meneses y col., 2017; Warsinger y col., 2018).

Dentro del tratamiento terciario, estas aguas también pueden someterse a procesos de desinfección, con la finalidad de eliminar todos aquellos microorganismos patógenos que puedan estar presentes en las mismas. Concretamente, las aguas regeneradas destinadas al riego en el sector agrícola, deberán someterse a este proceso con la finalidad de asegurar efectivamente la seguridad microbiológica de las mismas (EC, 2017; Cui y col., 2020; UE, 2020b; Truchado y col., 2021b). Como se ha comentado anteriormente (3.4. *Calidad y seguridad de las aguas de proceso*), la desinfección puede llevarse a cabo por diferentes metodologías, tanto químicas o físicas, siendo las tecnologías con cloro, PAA, UV y la combinación de éstas especialmente utilizadas en las plantas de tratamiento (Bueno y col., 2020). Sin embargo, tal y como se ha mencionado anteriormente, algunos de estos desinfectantes y, especialmente el cloro, pueden reaccionar con los restos de materia orgánica presente en las aguas residuales, generando DBPs clorados que pueden estar presentes en los efluentes tratados y que posteriormente serán destinados al riego agrícola, los cuales pueden tener efectos adversos tanto para el medio ambiente como para la salud de las personas por la acumulación durante el cultivo (Richardson y Ternes, 2011, 2018; Ding y col., 2013; Gong y Zhang, 2015; Sun y col., 2019; Zhong y col., 2019;

Tak y col., 2020). Diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de tecnologías de desinfección que prevenga la formación de subproductos en las aguas regeneradas para uso agrícola y su posible acumulación en los cultivos regados (EFSA, 2015; López-Gálvez y col., 2018; Bernstein y col., 2021; Sharma y col., 2021).

5.2. Regulación de las aguas regeneradas para su uso en agricultura

La UE ha dividido el agua regenerada destinada al riego agrícola en cuatro categorías, estableciendo para cada una de las categorías límites máximos permitidos de DBO, SST, turbidez, *E. coli*, *Legionella spp.*, y nematodos intestinales (UE, 2020b):

- Categoría A, que incluye “*todos los cultivos de alimentos que se consumen crudos en los que la parte comestible está en contacto directo con las aguas regeneradas y los tubérculos que se consumen crudos*”.
- Categoría B y C, que incluye “*todos los cultivos de alimentos que se consumen crudos cuando la parte comestible se produce por encima del nivel del suelo y no está en contacto directo con las aguas regeneradas, los cultivos de alimentos transformados y los cultivos no alimenticios*”.
- Categoría D, que incluye “*los cultivos destinados a la industria y a la producción de energía y semillas*”.

En cuanto al control de los subproductos de desinfección en este tipo de aguas, la legislación no establece límites máximos permitidos. Sin embargo, su control queda regulado como parte de los requisitos adicionales de la norma, que establece que podrían ser identificados como peligros potenciales para el medio ambiente, la salud humana o la sanidad animal, tras la realización de una evaluación de riesgos que lo determine. En ese caso, sería necesario el establecimiento de las medidas preventivas oportunas. Con el fin

de poder reutilizar las aguas regeneradas como agua de riego agrícola, durante los procesos de desinfección, se aplicarán las mínimas dosis efectivas que permitan el cumplimiento de los requisitos de seguridad microbiológica establecidos para estas aguas. De esta manera se evita, en la medida de lo posible, la formación de subproductos de desinfección derivados de estos tratamientos.

6. SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN (DBPs)

Los subproductos de desinfección, o disinfection byproducts (DBPs) en inglés, son aquellos compuestos que se forman debido a la reacción de los desinfectantes principalmente clorados (NaOCl , $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, Cl_2 , ClO_2 , cloraminas...etc.) y en menor medida los no clorados (O_3 , PAA, UV...etc.) con la materia orgánica, así como con los compuestos inorgánicos (nitritos, nitratos, bromuros, ioduros...etc.) presentes en las aguas (Simpson y Mitch, 2022). Aunque el principal precursor de estos compuestos son los ácidos fúlvicos y húmicos contenidos en la materia orgánica natural (NOM), muchos contaminantes de origen antropogénico, tales como fármacos, cosméticos, plaguicidas, herbicidas, tintes sintéticos, y detergentes, pueden actuar como precursores de los DBPs (Richardson y Postigo, 2015; Richardon y Ternes, 2018; Chaves y col., 2019; Diana y col., 2019; Srivastav y col., 2020). Las posibilidades de formación de DBPs son ilimitadas, en función de los precursores presentes en las aguas y susceptibles de reaccionar con los desinfectantes aplicados. Esto pone en evidencia la complejidad que existe, tanto de los mecanismos de formación de estos compuestos, así como de la identificación y la caracterización de los DBPs existentes (Sadiq y Rodriguez, 2004; Wang y col., 2010; Li y col., 2017a; Ersan y col., 2019; Salazar-Benítez y col., 2021). De forma general, cada desinfectante aplicado está asociado con la formación de un tipo de DBPs característico. Sin embargo, la formación de los distintos DBPs también estará

condicionada por las condiciones de desinfección y la naturaleza de los precursores presentes en el agua (Bond, y col., 2012). El cloro constituye el principal desinfectante utilizado debido a su potencial antimicrobiano, facilidad de operación y bajo coste (Sun y col., 2019). Además, se suma a que es el desinfectante más estudiado en lo referente a la formación de los DBPs, siendo muy selectivo en su reacción con los grupos funcionales de los compuestos orgánicos para la formación de estos subproductos, y habiendo sido descritas numerosas reacciones para la formación de los mismos. Por este motivo existe una mayor formación de DBPs clorados, en comparación con el resto (Zhang y col., 2004; Srivastav y col., 2020). Sin embargo, queda mucho por estudiar y conocer de la formación de los DBPs (Domínguez-Tello, 2017). Se han identificado más de 700 DBPs, aunque únicamente se ha profundizado en su formación, ocurrencia, toxicidad y métodos analíticos de medida en aproximadamente 100 de ellos (Richardson y Plewa, 2020). A pesar de los más de 700 DBPs identificados en la literatura, se desconoce más del 50% del total de compuestos orgánicos halogenados formados durante la cloración del agua (Sun y col., 2019). La importancia en el estudio de los DBPs radica en que estos compuestos pueden resultar perjudiciales para la salud, ya que muchos han sido catalogados como cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos y genotóxicos (Benson y col., 2017; Kali, y col., 2021).

Fue en la década de los 70s cuando se realizaron las primeras investigaciones sobre los DBPs en aguas cloradas. Un estudio realizado por el Fondo para la Defensa del Medio Ambiente de los Estados Unidos puso en evidencia la relación entre una mayor mortalidad por cáncer para los consumidores de agua potable tratada proveniente del río Mississippi que para aquellos que lo hacían de fuentes de agua subterránea (Harris y Page, 1974). Posteriormente, se relacionó el consumo del agua potable con el desarrollo de cáncer (Marx, 1974). En Europa, en 1974 el químico Johannes Rook, identificó el

cloroformo y otros tres THMs, los cuales se encontraban en concentraciones más altas en agua potable clorada que el agua sin tratar, aportando evidencias que relacionaban los THMs hallados con las reacciones entre el cloro y la NOM (Rook, 1974). Con el fin de poder cuantificar de forma más precisa dichos contaminantes, se desarrolló una técnica analítica basada en cromatografía de gases y su adsorción previa en espacio de cabeza para el análisis de compuestos volátiles, como los THMs (Rook, 1975; Hrudey, 2009). Estos hechos llevaron a la USEPA a realizar en 1975 uno de los primeros estudios para el análisis de DBPs, identificando los cuatro THMs descritos, así como otros dos compuestos orgánicos volátiles en unas 80 muestras de agua a lo largo de todo el país. Fue poco después, en 1976 cuando el cloroformo fue identificado como un compuesto potencialmente carcinógeno en ratas (National Cancer Institute [NCI], 1976; Sinha y col., 2021). Posteriormente, en 1980 se identificó un segundo grupo de DBPs, los HAAs, que podían encontrarse en las aguas potables en niveles iguales o superiores a los de los THMs. En 1987, estos hallazgos permitieron que en los Estados Unidos se analizara el agua tratada proveniente de 10 servicios públicos, encontrando alrededor de 198 compuestos, deduciendo su producción tras la cloración. Desde el descubrimiento de los DBPs se han llevado a cabo numerosos estudios para comprender su formación durante la desinfección, así como para reducir o minimizar su presencia en las aguas (Bond y col., 2012). El objetivo es determinar si los DBPs suponen un riesgo para la salud pública, realizando estudios epidemiológicos y buscando evidencias entre la exposición y los diversos tipos de cáncer o problemas reproductivos (Hrudey, 2009). Igualmente, es también importante destacar la toxicidad para los organismos acuáticos en caso de vertidos de aguas que contengan estos compuestos (Kali y col., 2021). Hay que tener en cuenta que los primeros hallazgos de DBPs en aguas cloradas también supusieron el punto de partida para el establecimiento de las primeras guías o regulaciones, principalmente en

agua potable (Sinha y col., 2021). La presencia de THMs y HAAs en las aguas es utilizada como un indicador de los DBPs regulados (Tak y col., 2020). Sin embargo, hay muchos otros DBPs que aún no han sido regulados, tales como halonitrometanos, haloamidas, halobenzoquinonas, haloacetnitrilos, halopirroles, nitrosaminas, aldehídos, o incluso los HAAs y THMs yodados (Richardson y col., 2007; Richardson y Ternes, 2011; Yang y Zhang, 2016; Wang y col., 2018; Dong y col., 2019; Salazar-Benítez y col., 2021). Muchos de los no regulados incluso presentan una toxicidad superior a los DBPs regulados (Luo y col., 2020). Cabe destacar que los THMs presentan una toxicidad relativamente baja en comparación con los halonitrometanos, los cuales no están regulados (Plewa y col., 2004; Kundu y col., 2004; Richardson y Plewa, 2020). Otro ejemplo consiste en el grupo de los haloacetnitrilos, los cuales presentaron una citotoxicidad unas 73 veces superior a la de los HAAs y alrededor de 320 veces a la de los THMs (Plewa y col., 2011; Srivastav y col., 2020).

6.1. Formación de los DBPs y su relación con los desinfectantes

La NOM consiste en una compleja mezcla de compuestos orgánicos formada por diferentes fracciones, tanto de naturaleza hidrófoba (ácidos fúlvicos, húmicos, hidrocarburos, taninos aromáticos...etc.) como hidrofílica (péptidos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos, lípidos...etc). La formación de los diferentes DBPs está asociada a la reacción de los distintos desinfectantes con los grupos funcionales de la NOM (Croué y col., 2000; Bond y col., 2012; Domínguez-Tello, 2017). Sin embargo, muchos otros compuestos de naturaleza antropogénica también han sido identificados como precursores de los DBPs, entre los que se encuentran los productos farmacéuticos, agentes antibacterianos, tintes textiles, pesticidas, bisfenol A,

tensioactivos o cianotoxinas (Gilca y col., 2020). Igualmente, las sustancias de naturaleza inorgánica tales como los iones bromuro o yoduro, amoníaco, nitritos y nitratos, también pueden actuar como precursores de los DBPs (Richardon y Ternes, 2018; Simpson y Mitch, 2022). En última instancia, los DBPs formados también pueden actuar como precursores intermediarios para la formación de otros tipos de DBPs (Sun y col., 2019).

Se ha puesto de manifiesto que diversas reacciones químicas pueden estar involucradas en la formación de los DBPs, pudiendo ser estos compuestos tanto de naturaleza orgánica como inorgánica (Srivastav y col., 2020). Las reacciones de sustitución son las más comunes en procesos de desinfección por cloración, donde el cloro del HOCl ataca a los átomos de carbono con carga negativa parcial, formando los subproductos clorados. Asimismo, debido a que la mayoría de agentes desinfectantes son oxidantes, las reacciones de oxidación-reducción, las cuales implican la transferencia de electrones entre los distintos compuestos, también se producen durante los procesos de desinfección. La NOM contiene grupos funcionales, tales como carboxilo, aromáticos, amino o hidroxilo, que reaccionan fácilmente con los desinfectantes oxidantes. Por otro lado, los aniones como bromuro y yoduro serán fácilmente oxidados a HBrO o HIO, formando subproductos bromados o yodados, respectivamente. Por último, la hidrólisis, mediante la ruptura de los enlaces por la adición de moléculas de agua, es otra de las reacciones involucradas en la formación de DBPs. Algunos estudios han mostrado que los HAAs y algunos otros DBPs trihalogenados podrían formar THMs vía hidrólisis (Zhang y col., 2015). Aunque no son tan comunes, las reacciones de adición, descarboxilación, deshidratación, sulfonación, y desaminación, entre otras, también contribuyen a la formación de los DBPs. Esto pone de manifiesto la complejidad de las reacciones englobadas en los procesos de desinfección que contribuyen a la formación de los DBPs, ocurriendo muchas de ellas de manera simultánea (Sun y col., 2019).

Dentro de los aproximadamente 700 DBPs identificados actualmente, existe una amplia variedad de grupos de distinta naturaleza y composición química, tanto orgánicos como inorgánicos, organohalogenados o sin elementos halógenos en su composición. Los grupos más conocidos de DBPs alifáticos incluyen THMs y HAAs. Los THMs, son compuestos altamente volátiles que constituyen el mayor grupo de DBPs, seguido del grupo de los HAAs, los cuales presentan naturaleza no volátil. Ambos grupos representan alrededor del 25% del total de los DBPs. Asimismo, otros grupos de DBPs alifáticos que incluyen halocetonas, haloaldehídos o DBPs nitrogenados, tales como haloacetoneitrilos, halonitrometanos y haloacetamidas, favorecidos por la presencia de amoníaco en las aguas. Estos grupos se forman en la mayoría de aguas cloradas, pero por poco tiempo, estando presentes en menor proporción que los THMs y HAAs. De hecho, son conocidos como DBPs intermediarios, ya que se hidrolizan a altas temperaturas y pH. En muchas ocasiones se generan instantáneamente durante la desinfección de las aguas, aunque se descomponen rápidamente mediante reacciones con el desinfectante residual o mediante reacciones de hidrólisis (Hong y col., 2013; Ding y col., 2018; Stefán y col., 2019; Kali y col., 2021). Otro amplio grupo de DBPs emergentes, los DBPs aromáticos se forman mediante las reacciones de los desinfectantes con las sustancias aromáticas presentes en la fracción húmica de la NOM. Éstos se clasifican en fenil-DBPs (halopéptidos, halofenoles, halobenzoquinonas, halofenilacetoneitrilos, halohidroxibenzaldehídos, halonitrofenoles, ácidos halobencenosulfónicos, halopirinas y ácidos halohidroxibenzoicos), y los DBPs heterocíclicos, que incluyen principalmente halofuranonas y halopirroles. Estos compuestos son inestables y se descomponen en condiciones alcalinas y con un exceso de cloro, habiendo sido identificado más de 100 DBPs aromáticos en las aguas y siendo las halofuranonas el principal grupo. Se ha sugerido que la toxicidad de los DBPs aromáticos puede ser hasta unas 100 veces superior

a la de los compuestos alifáticos (Zhai y col., 2014; Wang y col., 2016a; Zhang y col., 2018; Yang y col., 2019a; Liu y col., 2019, 2020; Jiang y col., 2020; Kali, 2021). Por otra parte, los DBPs inorgánicos incluyen subproductos como clorato, clorito, bromato, yodato, nitrato, y nitrito entre otros, o entre los DBPs no halogenados como aldehídos, ácidos carboxílicos, cetonas, y benceno (Mazhar y col., 2020).

Aunque tal y como se ha descrito, la formación de los diferentes tipos de DBPs es muy compleja y depende de varios factores, tales como las condiciones de desinfección y los precursores presentes en las aguas, de forma general, y aunque en los estudios previos hay disparidad en alguno de los grupos, cada desinfectante está asociado a la formación de unos grupos de DBPs característicos (Simpson y Mitch, 2022).

En la **Tabla 1.2** se muestran los DBPs más comunes asociados a los principales desinfectantes (cloro, cloraminas, ClO_2 y O_3). Como se puede ver, el cloro genera numerosas clases de DBPs, siendo los THMs y HAAs los compuestos organohalogenados más característicos, pero también teniendo en cuenta la formación de otros subproductos, incluso inorgánicos, como clorato y bromato e incluso compuestos no halogenados, como aldehídos. Asimismo, la utilización de cloraminas, aunque no tan extendida para la desinfección de aguas de proceso o aguas residuales, sí lo es para agua potable, pudiendo generar diversos DBPs, principalmente nitrogenados, tales como nitrosaminas, haloacetamidas, haloacetanitrilos, y halonitrometanos además de THMs y HAAs (Li y Mitch, 2018; Sinha y col., 2021). En comparación con la cloración, la desinfección con cloramina produce menor concentración de THMs (Mazhar y col., 2020). Asimismo, el ClO_2 en contacto con las sustancias oxidables de las aguas, tanto orgánicas como inorgánicas, se degrada a iones clorito, clorato y cloruro, lo que reduce la posibilidad posterior de formación de THMs y HAAs (Al-Otoum y col., 2016; Ye y col., 2019; Gilca y col., 2020). Por otra parte, el principal desinfectante no clorado, que interviene en la

formación de DBPs es el O₃, formando bromato como principal subproducto y cuya concentración está sujeta a la presencia de niveles de iones de bromuro en el agua (von Gunten, 2003; Simpson y Mitch, 2022). El O₃ puede formar HBrO y THMs bromados por oxidación del bromuro presente en las aguas (Mazhar y col., 2020). La formación de ácidos carboxílicos también está asociada a los procesos de desinfección, especialmente con el uso de cloro y O₃, variando su cantidad en función de la calidad del agua y del proceso de desinfección (Richardson, 2018; Gilca y col., 2020).

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, los métodos físicos como la radiación UV o los químicos como el PAA, se utilizan para evitar y/o reducir la formación de estos DBPs. Sin embargo, en algunas circunstancias se siguen generando DBPs. Así, un estudio en agua potable mostró que la desinfección con luz UV seguido de una cloración secundaria pudo contribuir a la formación de halonitrometanos (Reckhow y col., 2010; Shah y col., 2011; Richardson y Plewa, 2020; Simpson y Mitch, 2022). Asimismo, Domínguez-Henao y col. (2018a) concluyeron que, aunque la adición de PAA podía oxidar los iones haluro a ácido hipohaloso, pudiendo reaccionar con la materia orgánica formando DBPs halogenados, la mayoría de DBPs formados con el PAA fueron ácidos carboxílicos, con formación limitada o inexistente en compuestos halogenados, aldehídos, epóxidos y N-nitrosaminas. Sin embargo, Lee y Huang (2019) demostraron la formación de aldehídos y otros DBPs tales como THMs y HAAs tanto en agua de proceso como en lechuga lavada con una concentración de 100 mg L⁻¹ de PAA.

Tabla 1.2. Subproductos de desinfección (DBPs) asociados a los principales desinfectantes (OMS, 2000; Sinha y col., 2021).

Desinfectante	DBPs organohalogenados	DBPs inorgánicos	DBPs no halogenados
Cloro	Trihalometanos, ácidos haloacéticos, haloacetnitrilos, hidrato de cloral, cloropicrina, clorofenoles, N-cloraminas, halofuranonas, bromohidrinas, mutágeno X (3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-5H-furan-2-ona), haloacetona, halonitrometano, haloacetamida	Clorato, bromato	Aldehídos, ácidos cianoalcanoicos, ácidos alcanoicos, benceno, ácidos carboxílicos
Dióxido de cloro (ClO₂)		Clorato, clorito	
Cloramina	Haloacetnitrilos, cloruro de cianógeno, cloraminas orgánicas, hidrato de cloral, halocetonas, trihalometanos, ácidos haloacéticos, hexaclorociclopentadieno, halonitrometano, haloacetamida	Nitrato, nitrito, clorato, hidracina	Aldehídos, cetonas, nitrosaminas
Ozono (O₃)	Tribromometano, ácido monobromoacético, ácido dibromoacético, dibromoacetona, bromuro de cianógeno	Clorato, yodato, bromato, peróxido de hidrógeno, ácido hipobromoso, epóxidos	Aldehídos, cetoácidos, cetonas, ácidos carboxílicos

6.2. Parámetros que influyen en la formación de los DBPs

Aunque tal y como se ha descrito anteriormente, el desinfectante utilizado influye en la formación de los distintos tipos de DBPs, otros factores tales como la influencia de la naturaleza de la NOM, la dosis de desinfectante, la temperatura, el pH, el tiempo de reacción o la composición del agua son factores que pueden condicionar los mecanismos de formación de los DBPs, principalmente a aquellos de naturaleza orgánica (Domínguez-Tello, 2017; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021; Srivastav y col., 2020) (**Figura 1.8**).

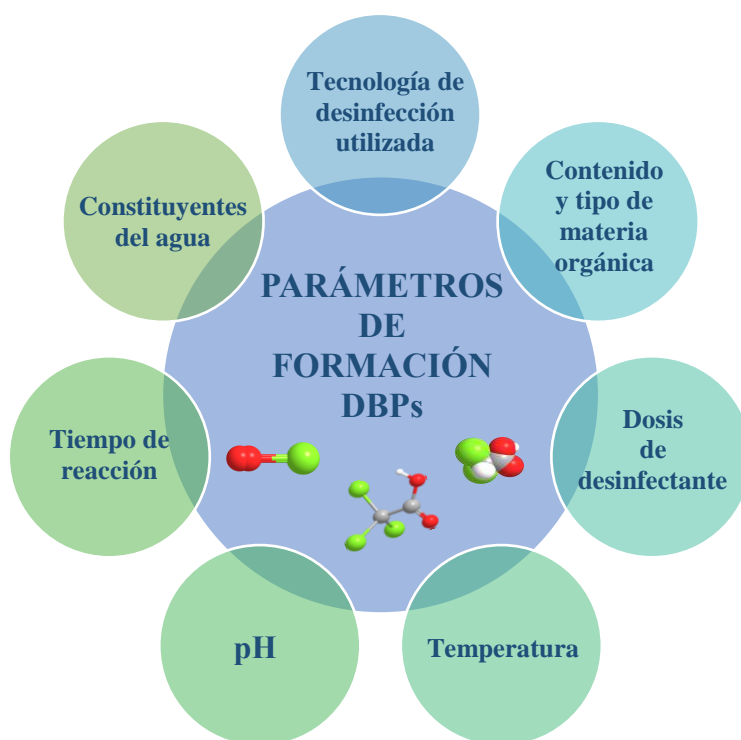


Figura 1.8. Principales parámetros que influyen en la formación de los subproductos de desinfección (DBPs).

Contenido en materia orgánica

La mayoría de los DBPs se forman debido a la reacción de los desinfectantes con la materia orgánica presente en las aguas, por lo que la NOM juega un papel fundamental en la formación de estos subproductos. La estructura, hidrofobicidad y peso molecular de

la materia orgánica afecta a la formación de los DBPs. La materia orgánica hidrófoba está compuesta en mayor medida por compuestos de alto peso molecular, como sustancias húmicas, mientras que la hidrófila está formada mayoritariamente por compuestos de bajo peso molecular, como carbohidratos, ácidos carboxílicos, y aminoácidos, entre otros. Se ha descrito que las fracciones hidrófilas de bajo peso molecular promueven la formación de DBPs bromados, tales como bromodiclorometano (BDCM) y dibromoclorometano (DBCM), debido a su reactividad hacia el HBrO e HIO formados durante la cloración de aguas ricas en bromuro y yoduro. En cambio, las sustancias húmicas, de naturaleza hidrófoba y alto peso molecular se relacionan con la formación de THMs y de HAAs, así como con la formación de DBPs aromáticos, debido a la presencia de grupos fenólicos (Liang y Singer, 2003; Diemert y col., 2013; Korotta-Gamage y Sathasivan, 2017; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021).

Dosis de desinfectante

El aumento en la dosis del desinfectante, que significa un aumento en concentración o bien en el tiempo de contacto, conducirá a la mayor formación de DBPs. En el caso del cloro, al aumentar la dosis se formará más HOCl, el cual reaccionará con la materia orgánica, generando mayor concentración de THMs y HAAs. Sin embargo, los DBPs intermediarios, aunque también aumentan con la dosis de desinfectante, lo hacen hasta un cierto límite en función de la estabilidad de éstos según la dosis, el pH y el tiempo de contacto, pudiendo reaccionar con el cloro residual para producir otros DBPs, tales como THMs o HAAs. Se ha demostrado que a altas dosis de cloro los DBPs heterocíclicos se descomponen en THMs y HAAs (Zhang y col., 2017; Hu y col., 2019; Mompremier y col., 2019; Stefán y col., 2019; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021).

Temperatura

La temperatura afecta a la cinética de las reacciones necesarias para la formación de los DBPs, por lo que un aumento de la temperatura llevaría a demandas más altas de cloro, y por lo tanto a la formación de mayores cantidades de DBPs. El aumento de la temperatura también contribuye al escape de cloro residual, así como al aumento de la actividad microbiana, aumentando la demanda de cloro para mantener la concentración residual necesaria para la desinfección (Sadiq y Rodriguez, 2004; Sinha y col., 2021). Sin embargo, las altas temperaturas pueden degradar aquellos subproductos que no son térmicamente estables, favoreciendo por ejemplo la volatilización de los THMs, siendo el cloroformo el THM más estable con el incremento de la temperatura. Asimismo, la influencia de la temperatura en los HAAs es variable, ya que su generación aumenta con la temperatura desde los 10 °C a los 20 °C, pero decrece conforme sigue aumentando hasta los 30 °C, debido principalmente a la inestabilidad de los HAAs trihalogenados a temperaturas más elevadas. Las altas temperaturas también influyen en la descomposición de otros DBPs tales como haloacetoneitrilos, halocetonas o haloaldehídos (Chowdhury y col., 2011; Stefán y col., 2019; Kali y col., 2021).

pH

Este factor es complejo y puede afectar de manera diferente atendiendo a la naturaleza de los DBPs (Domínguez-Tello, 2017). Como norma general, ante un pH elevado (por encima de 7.6), el ClO^- sería la especie dominante en el proceso de desinfección, teniendo esta especie menor potencial desinfectante y, por tanto, disminuyendo la formación de DBPs. Sin embargo, la variación del pH puede afectar de manera desigual a la formación de DBPs, atendiendo al subproducto estudiado. Se ha

observado que la formación de THMs aumenta en rangos de pH entre 6.0 y 8.0, ya que se facilita las reacciones de halogenación, así como las reacciones de hidrólisis de DBPs intermediarios, tales como trihaloacetaldehídos o trihalopropanonas (Xie, 2003; Fang y col., 2009; Hong y col., 2013; Sinha y col., 2021). Sin embargo, valores más bajos de pH favorecen la generación de HAAs, aumentando su formación a pHs cercanos a 4.0, manteniéndose estables a pHs entre 6.0 y 8.0 y disminuyendo sus concentraciones a pHs más elevados (Kali y col., 2021). Existe discrepancia en cuanto al efecto del pH sobre los HAAs, ya que un estudio muestra que un incremento del pH entre 6.0 y 8.0 provocó una disminución de los HAAs trihalogenados, y sólo un ligero impacto en los mono- y dihalogenados. Asimismo, otros estudios muestran que la formación del ácido dicloroacético (DCAA) aumenta a un pH más elevado (Liang y Singer, 2003; Nikolaou y col., 2004; Sinha, y col., 2021). Por otra parte, el regulador de pH utilizado también puede tener un efecto en la formación de determinados DBPs. En esta línea, Fan y Sokorai (2015) observaron que, cuando se añadió ácido cítrico para regular el pH en agua de proceso clorada, se generaron alrededor de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de THMs, mientras que se detectaron menos de $35 \mu\text{g L}^{-1}$ cuando se utilizó fosfato de sodio como regulador de pH.

Tiempo de reacción

Aunque este parámetro también puede interferir de manera distinta en la formación de los diferentes grupos de DBPs, de manera general, si aumenta el tiempo de reacción entre el desinfectante y los precursores de los DBPs presentes en las aguas, se producirá una mayor formación de DBPs, debido al mayor tiempo de contacto con el cloro residual. El cloro reacciona rápidamente con los grupos activos de la NOM y con el resto de compuestos precursores, produciéndose una alta formación de DBPs al principio. Sin embargo, con el tiempo se reducirá la disponibilidad de grupos activos, así como de

cloro residual, traduciéndose en una reducción de la ratio de reacción y una disminución en la formación de los DBPs. Estudios previos han observado un aumento en la formación de THMs y HAAs hasta un tiempo de reacción de 2 horas (Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021).

Constituyentes del agua

Diversos constituyentes del agua pueden influir en la formación de los DBPs. Por ejemplo, los iones bromuro presentes en las aguas pueden ser oxidados a HBrO tras la cloración. Asimismo, las especies de bromo formadas (HBrO/OBr) pueden dar lugar a subproductos bromados a partir de reacciones de sustitución. Un estudio demostró que, en la formación de THMs se produjo entre un 5-10% de especies cloradas en relación con los niveles de especies bromadas (50%). De manera general, la cloración del agua genera cloroformo como el THM predominante. Sin embargo, los THMs bromados son las especies dominantes en presencia de altas concentraciones de bromuro en las aguas. Asimismo, aunque el ácido dicloroacético (DCAA) y tricloroacético (TCAA) son las especies de HAAs predominantes tras la cloración, con altas concentraciones de bromuro las especies predominantes fueron ácido dibromoacético (DBAA) y tribromoacético (TBAA), así como bromo-cloro-HAAs. Asimismo, la cloración de las aguas con elevados niveles de yoduro puede llevar a la formación de THMs. El yoduro es oxidado por la acción de los desinfectantes, formando especies reactivas de yodo (HIO, yodo y radical yoduro), pudiendo reaccionar con la NOM generando subproductos yodados, o bien oxidarse a yodato como una forma relativamente estable (Amy y col., 1991; Pourmoghaddas y col., 1993; Westerhoff y col., 2004; Hua y col., 2006; Souaya y col., 2015; Li y col., 2020; Sinha y col., 2021). De igual manera, la presencia de amonio en las aguas favorece la formación de DBPs nitrogenados (Kali y col., 2021).

6.3. Trihalometanos (THMs)

Los THMs constituyen el principal grupo de DBPs, siendo una clase de compuestos derivados del metano (CH_4), en el que los cuatro átomos de hidrógeno pueden ser sustituidos por halógenos (**Figura 1.9**). De entre todos ellos, cuatro son los mayoritarios, y la suma se expresa como THM4. Los THMs se forman durante los procesos de desinfección por cloración, pudiendo originar THMs bromados si hay presencia de iones bromuro en las aguas. El cloroformo o TCM constituye el principal THM formado durante los procesos de cloración (Mazhar y col., 2020). El resto de THMs corresponden a bromodiclorometano (BDCM), clorodibromometano (CDBM) y tribromometano (TBM) (Sinha y col., 2021).

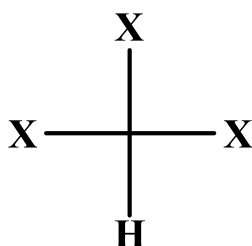


Figura 1.9. Estructura molecular de los THMs (X representa los halógenos).

En general, estos compuestos son permeables a la piel y altamente volátiles. Sin embargo, cada compuesto individual posee ligeras variaciones en sus propiedades físico-químicas, y toxicológicas, siendo los compuestos bromados los que presentan mayor genotoxicidad que los clorados (Du y col., 2017; Srivastav y col., 2020). Asimismo, el cloroformo resulta altamente volátil mientras que los THMs bromados son más lipofílicos que el resto. Los THMs pueden formarse tanto por las reacciones descritas anteriormente a partir de la acción de los desinfectantes con la NOM, o bien a partir de reacciones de

hidrólisis de DBPs intermediarios (Hong y col., 2013; Villanueva y col., 2016; Kali y col., 2021).

6.4. Ácidos haloacéticos (HAAs)

Los HAAs representan el segundo principal grupo de DBPs en aguas cloradas. Éstos son ácidos carboxílicos en los que los halógenos sustituyen a uno, dos o los tres átomos correspondientes a los hidrógenos no ácidos de la molécula de ácido acético, generando mono-, di-, tri-HAAs (Mao, 2016; Srivastav y col., 2020) (**Figura 1.10**). Éstos incluyen cinco HAAs regulados: ácido monocloroacético (MCAA), dicloroacético (DCAA), tricloroacético (TCAA), monobromoacético (MBAA), y dibromoacético (DBAA) indicándose la suma como HAA5. Asimismo, hay otros cuatro principales no regulados: ácido tribromoacético (TBAA), bromocloroacético (BCAA), bromodicloroacético (BDCAA) y clorodibromoacético (CDBAA), correspondiendo la suma total de los nueve a HAA9. Al igual que con los THMs, éstos se pueden formar durante los procesos de desinfección por cloración, formando a su vez HAAs bromados si hay presencia de iones bromuro en las aguas (Sinha y col., 2021). En términos generales podría decirse que los procesos de reacción entre el desinfectante y la NOM contribuiría en un 80% a la formación de los HAAs, mientras que el resto de HAAs se podrían formar debido a la reacción de los DBPs intermediarios con el cloro (Kali y col., 2021).

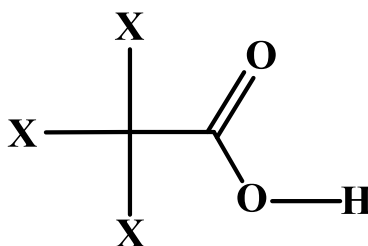
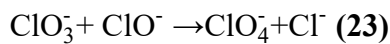
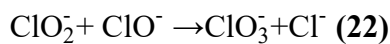
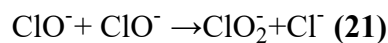


Figura 1.10. Estructura molecular de los HAAs (X representa los halógenos).

Los HAAs presentan alta polaridad y una menor volatilidad en comparación con los THMs. Asimismo, las altas temperaturas y los elevados valores de pH podrían favorecer la descomposición de los HAAs a compuesto más simples, como los THMs (Zhang y Minear, 2002; Golfinopoulos y col., 2003; Emmert y col., 2009; Srivastav y col., 2020).

6.5. Clorato (ClO_3^-)

Constituyen el principal grupo de DBPs inorgánicos. A diferencia de los subproductos orgánicos descritos, que se forman debido a la interacción del cloro con la materia orgánica presente en las aguas, el clorato se forma como subproducto de degradación del cloro. Tanto el NaOCl , como el Ca(OCl)_2 , ClO_2 , y en menor medida Cl_2 , pueden originar subproductos como clorato, clorito y perclorato. En disolución acuosa el NaClO y el Ca(OCl)_2 son disociados a las formas activas del cloro HOCl/ClO^- . Posteriormente, la degradación del ClO^- resultaría en la formación de clorato y perclorato (ClO_4^-), con un paso previo de formación de clorito (ClO_2^-) (**Ecuaciones 21-23**):



Por otra parte, aunque el ClO_2 , también puede formar clorito y clorato, éste lo hace por otra ruta distinta a la descrita para los desinfectantes anteriores. El ClO_2 originará estos DBPs mediante una reacción de dismutación (**Ecuación 24**):



Existen diferentes parámetros, tales como la dosis de desinfectante, el pH o la temperatura que pueden influir en la formación de estos DBPs. El aumento de la temperatura favorece la cinética de las reacciones indicadas, dando lugar a una mayor formación de estos subproductos. Asimismo, valores de pH por debajo de 11.0 incrementan la ratio de descomposición de las especies activas del cloro en clorato (AHDB, 2016). Se recomienda el mantenimiento de las soluciones de hipoclorito a pHs entre 11.0-13.0, ya que por debajo de esos valores el hipoclorito comienza a degradarse, formando los DBPs indicados (Adam y Gordon, 1999; Simpson y Mitch, 2022).

6.6. Efecto en la salud de los DBPs

Desde el descubrimiento de los primeros DBPs en aguas cloradas, se han realizado una gran cantidad de estudios epidemiológicos sobre los posibles efectos de estos subproductos para la salud de la población, especialmente para estudiar la relación entre estos subproductos y la incidencia de distintos tipos de cáncer o riesgos adversos en el sistema reproductivo (Hrudey, 2009). Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de los DBPs en los últimos años, aún queda mucho que conocer en cuanto a la identificación, mecanismo de formación y de acción y, en particular, sus efectos sobre la salud de las personas, incluido el posible efecto para los organismos acuáticos en caso de vertidos de las aguas cloradas. Se conoce que estos compuestos son perjudiciales para la salud de la población, habiendo sido catalogados muchos de ellos como cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, citotóxicos, genotóxicos, disruptores endocrinos, así como otros efectos toxicológicos asociados (Benson y col., 2017; Richardson y Plewa, 2020; Sun y col., 2019; Kali y col., 2021). Asimismo, diversos estudios epidemiológicos relacionan los DBPs con el riesgo de cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, aborto espontáneo y defectos de nacimiento. Varios autores han descrito diferentes rutas de exposición a los DBPs tales

como la respiración, su ingestión o la absorción a través de la piel (Allen y col., 2017; Wright y col., 2017a; Srivastav y col., 2020). Igualmente, se han evaluado más de 100 DBPs con la finalidad de crear una base de datos en cuanto a la toxicidad de estos subproductos, incluyendo estudios de citotoxicidad y genotoxicidad realizados utilizando células de ovario de hámster chino (CHO) no neoplásicas. Las conclusiones de estos estudios fue que los DBPs pueden ser clasificados con el siguiente orden de toxicidad decreciente: yodo-DBPs > bromo-DBPs > cloro-DBPs, siendo mucho más tóxicos los DBPs yodados y bromados que aquellos que contienen el cloro como constituyente halogenado. Atendiendo a los estudios en las células CHO se catalogó un DBP no regulado, el ácido yodoacético, como uno de los más genotóxicos descubiertos, siendo tumorigénico afectando al sistema endocrino e induciendo efectos adversos en el sistema reproductivo (Plewa y col., 2002; Wagner y Plewa, 2017; Richardson y Plewa, 2020). Asimismo, los fenil DBPs nitrogenados se han considerado más tóxicos que los fenil DBPs carbonosos, debido posiblemente a la naturaleza hidrofílica de estos últimos (Zhang y col., 2018; 2020a; Kali y col., 2021). Otros estudios toxicológicos, que también utilizaron células CHO, pusieron en evidencia que los acetaldehídos, haloacetanitrilos y las haloacetamidas presentaron una toxicidad y genotoxicidad ampliamente mayor que los THMs y HAAs regulados en agua potable (Wagner y Plewa, 2017; Simpson y Mitch, 2022). Todos estos hallazgos ponen en evidencia la necesidad de seguir profundizando en el estudio de los DBPs, tanto aquellos regulados como los que no han sido todavía regulados y que son considerados emergentes, pudiendo causar estos últimos un daño más perjudicial para la salud de la población.

También se ha descrito el efecto de algunos de los DBPs sobre organismos acuáticos. Se han evaluado los efectos de los THMs y HAAs en el desarrollo del embrión de pez cebra en un rango de concentraciones de 20-100 mg L⁻¹, causando los THMs

efectos en el desarrollo, daño leve en el ADN, así como la reducción de la longitud de la cola. Asimismo, tanto el DCAA como el TCAA aumentaron la tasa de malformación de este organismo modelo. Otro estudio realizado en la especie *Cyprinus carpio* mostró cambios bioquímicos y daño hepático, inducidos por el cloroformo y el yodoformo (Perveen y col., 2019; Kali y col., 2021).

THMs

Dentro de este grupo, el cloroformo y el BDCM han sido clasificados como posiblemente carcinógenos para el ser humano (grupo 2B) por la IARC (World Health Organization International Agency for Research on Cancer [WHO IARC], 2017). Asimismo, la USEPA, a través de su Sistema Integrado de Información de Riesgos, también ha clasificado al cloroformo, BDCM y TBM como probables carcinógenos en humanos, así como al CDBM como posible carcinógeno (Sinha y col., 2021). Asimismo, de manera general, los THMs están relacionados con diversos efectos adversos para la salud como trastornos del hígado, del sistema renal, del sistema nervioso, así como citotoxicidad, genotoxicidad y defectos de nacimiento (Gopal y col., 2007; Cantor y col., 2010; Mishra y col., 2014; Srivastav y col., 2020). Estudios epidemiológicos han relacionado la ingestión de THMs con un mayor riesgo de cáncer de vejiga, así como posibles efectos en el sistema reproductivo (Chaukura y col., 2020; Sinha y col., 2021). Un estudio relacionó a los THMs con hepatotoxicidad, hiperplasia en vejiga urinaria y metaplasia en intestino delgado en un estudio llevado a cabo durante un mes en ratas Wistar, y utilizando dosis de 16.17 mg kg^{-1} (Abd El-Halim y col., 2017; Kali y col., 2021). Igualmente, otro estudio relacionó estos DBPs con un mayor riesgo de defectos congénitos (Chisholm y col., 2008).

HAAs

Algunos de estos DBPs, en concreto DCAA, TCAA, DBAA y BCAA han sido clasificados como posiblemente carcinógenos para el ser humano (grupo 2B) por la IARC (WHO IARC, 2011, 2014). Asimismo, la USEPA también ha clasificado dos de estos HAAs, el DCAA y el TCAA, como probable y posible carcinógenos humanos, respectivamente (Sinha y col., 2021). En este contexto, la OMS, dentro de sus Guías para la calidad del agua potable (OMS, 2017) publicó un resumen sobre la toxicología, mutagenicidad y carcinogénesis de los DCAA, TCAA y BCAA. Asimismo, según los resultados publicados por Tao y col. (1998), DCAA y TCAA causaron tumores hepáticos en ratones B6C3F1 y en el estudio realizado por Plewa y col. (2002), MCAA, MBAA, DBAA y TBAA resultaron mutagénicos en bacterias y genotóxicos en células de mamíferos (Tang y col., 2020). Además, los HAA también se han relacionado con otros efectos negativos en la salud como trastornos reproductivos y trastornos del hígado, riñón, bazo o retraso del crecimiento (Srivastav y col., 2020).

Clorato

Se considera que estos subproductos actúan como disruptores endocrinos, afectando a la correcta funcionalidad de la glándula tiroidea, con posible efecto carcinógeno. También puede afectar al sistema inmunitario, causando hipersensibilidad (Feretti y col., 2008; Gilca y col., 2020), así como estrés oxidativo o afectar al desarrollo fetal. Se ha descrito que tanto el clorato como el perclorato causarían la inhibición competitiva del contranportador sodio-yoduro (NIS), que se encuentra en la glándula tiroidea para el transporte de yoduro en las células foliculares, como primer paso para la síntesis de las hormonas tiroideas. El perclorato sería un inhibidor mucho más potente

que el clorato, debido a su mayor afinidad de captación por el NIS (Van Sande y col., 2003; Di Bernardo y col., 2011; McCarthy y col., 2018).

6.7. Regulación de los DBPs: THMs, HAAs y clorato

De entre los aproximadamente 700 DBPs identificados, únicamente unos pocos han sido regulados por los principales organismos, tales como USEPA, OMS y UE. Cabe destacar que únicamente se han establecidos límites máximos en agua potable para unos pocos DBPs, entre los que destacan cuatro THMs, cinco HAAs, clorato, clorito, bromato, dicloroacetnitrilo, dibromoacetnitrilo, 2,4,6,- triclorofenol o n-nitrosodimetilamina. La OMS también tiene en cuenta otros DBPs tales como bromocloroacetnitrilo, hidrato de cloral, cloroacetonas, 2-clorofenol, cloropicrina, cloruro de cianógeno, 2,4-diclorofenol, formaldehído, tricloroacetnitrilo o mutágeno X (3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-5H-furan-2-ona), aunque no establece valores límite de referencia para éstos últimos, bien porque no existen datos suficientes para calcular un valor de referencia basado en efectos sobre la salud, o bien porque se encuentran en concentraciones mucho menores a las que pueden producir efectos perjudiciales sobre la salud. En la legislación existente, aquellos no sujetos a ninguna regulación se les conoce como DBPs emergentes (United States Environmental Protection Agency. [USEPA], 1998, 2006; Domínguez-Tello, 2017; OMS, 2017; UE, 2020a).

THMs

En Europa, para el agua potable, se establece un límite máximo para los THM4 de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, la Directiva relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano también aconseja obtener un valor por debajo de este límite, siempre y

cuando el proceso de desinfección no se vea afectado (UE, 2020a). Asimismo, la USEPA establece un valor máximo de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ para los THM4. Esta entidad también establece unas metas de cumplimiento para los niveles máximos de tres de estos THMs, siendo $0 \mu\text{g L}^{-1}$ para TBM y BDCM, $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para CDBM y $70 \mu\text{g L}^{-1}$ para TCM (USEPA, 1998; 2006). La OMS no establece un valor límite máximo para la suma de THM4, sino que lo hace de forma individual para TCM ($300 \mu\text{g L}^{-1}$), CDBM y TBM ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), así como para BDCM ($60 \mu\text{g L}^{-1}$) (OMS, 2017) (**Tabla 1.3**). Sin embargo, aunque existe una extensa regulación de estos DBPs en agua potable, no existen niveles máximos de THMs para agua de proceso o producto vegetal. Asimismo, tal y como se ha mencionado anteriormente, la regulación de los DBPs en las aguas regeneradas para su uso en la agricultura, tampoco establece límites máximos permitidos, sino que únicamente establece la necesidad de realizar una evaluación de riesgos asociada a los potenciales peligros de los DBPs para el medio ambiente, la salud humana o la sanidad animal.

HAA5

En cuanto a los HAA5, aunque hasta hace poco estos DBPs no estaban regulados en la UE, recientemente a través la Directiva relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano, se ha establecido un valor máximo para la suma de HAA5 de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ (UE, 2020a). Asimismo, la USEPA también establece el nivel máximo en $60 \mu\text{g L}^{-1}$ para los HAA5. Esta entidad también ha establecido unas metas para los niveles máximos individuales de 70 y $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para MCAA y TCAA, respectivamente y de $0 \mu\text{g L}^{-1}$ para DCAA (USEPA, 1998, 2006). Además, las Guías para la calidad del agua de consumo humano de la OMS (OMS, 2017) establecen niveles máximos para MCAA, DCAA y TCAA de 20 , 50 y $200 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (**Tabla 1.3**). Sin embargo, al igual que

ocurre con los THMs, no se ha regulado un nivel máximo de HAAs en agua de proceso o en producto vegetal.

Clorato

La UE establece un límite máximo para agua potable de 0.25 mg L⁻¹, o de 0.7 mg L⁻¹ cuando se utilice un método de desinfección que genere clorato (UE, 2020a). Asimismo, la OMS establece un límite de 0.7 mg L⁻¹ (OMS, 2017), aunque la USEPA no ha fijado niveles máximos para estos DBPs inorgánicos (USEPA, 1998; 2006) (**Tabla 1.3**). Sin embargo, aunque el nivel máximo no está regulado en agua de proceso, recientemente la Comisión Europea ha regulado los niveles máximos residuales de clorato en determinados productos alimentarios, tales como frutas, hortalizas, leguminosas, semillas, cereales o productos de origen animal, entre otros (EU, 2020c). Los límites máximos en los distintos productos vegetales son variables, dependiendo de su capacidad de acumulación y lo que es viable en su producción.

Tabla 1.3. Límite máximo residual de los distintos subproductos de desinfección (DBPs) para agua potable (USEPA, 1998, 2006; OMS, 2017; UE, 2020a).

DBPs	Límite máximo residual para agua potable		
	UE	USEPA	OMS
THM4	100 µg L ⁻¹	80 µg L ⁻¹	-
TCM	-	-	300 µg L ⁻¹
BDCM	-	-	60 µg L ⁻¹
CDBM	-	-	100 µg L ⁻¹
TBM	-	-	100 µg L ⁻¹
HAA5	60 µg L ⁻¹	60 µg L ⁻¹	-
MCAA	-	-	20 µg L ⁻¹
DCAA	-	-	50 µg L ⁻¹
TCAA	-	-	200 µg L ⁻¹
Clorato	0.25 o 0.7 mg L ⁻¹	-	0.7 mg L ⁻¹

Triclorometano (TCM), bromodichlorometano (BDCM), clorodibromometano (CDBM), tribromometano (TBM), suma de los cuatro trihalometanos (THM4), ácido monocloroacético (MCAA), ácido dicloroacético (DCAA), ácido tricloroacético (TCAA), suma de los cinco ácidos haloacéticos: ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido dibromoacético, ácido tricloroacético y ácido tribromoacético (HAA5).

6.8. Presencia de DBPs en la industria agroalimentaria

Diversas investigaciones han demostrado la generación y acumulación de DBPs en las líneas comerciales de lavado de productos hortofrutícolas, principalmente asociados a la utilización de desinfectantes clorados en estas aguas. Por ejemplo, Coroneo y col. (2017) evaluaron la presencia de THMs en diferentes productos de IV gama, tales como zanahorias, lechuga, ensalada mixta, perejil, ajo, rúcula y valeriana, después de

haber sido lavados con agua clorada, y enjuagados posteriormente. El 95% de todas las muestras presentaron uno o varios de los cuatro THMs analizados, con un valor promedio para los THM4 de $76.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, dentro de un rango de $0.5\text{-}1085 \mu\text{g kg}^{-1}$, identificando al cloroformo con mayor frecuencia en los productos analizados, pero encontrando variabilidad en la concentración del resto de THMs, dependiendo del tipo producto. Asimismo, López-Gálvez y col. (2019) analizaron la presencia de THMs y clorato tanto en agua de lavado como en producto proveniente de una planta de procesamiento industrial. En este caso, se analizó la presencia de estos DBPs en varias líneas de procesamiento de brotes tiernos, lechuga fresca cortada y vegetales rallados en el producto sin lavar, y tras el lavado y el enjuagado posterior. La concentración media de clorato en el agua de lavado se situó en el rango entre $1.2\text{-}29.1 \text{ mg L}^{-1}$, para todos los productos estudiados. En cuanto a los THMs, la concentración media fue entre $34.1\text{-}2635.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Con respecto a los productos lavados, la concentración media de clorato se situó en 197.5 , 180.9 y 117.3 mg kg^{-1} para brotes tiernos, lechuga y vegetales rallados, respectivamente. Asimismo, la concentración de THMs fue de 19.9 , 16.2 y $19.4 \mu\text{g kg}^{-1}$, en brotes tiernos, lechuga y vegetales rallados, respectivamente. En este estudio también se demostró que el enjuague final redujo significativamente la concentración de DBPs en ambos casos.

Cardador y Gallego (2012) analizaron los HAAs de varios productos mínimamente procesados, entre ellos zanahorias, lechuga iceberg, lechuga romana, achicoria, espinacas y ensaladas mixtas. Estas investigadoras observaron que alrededor del 23% de estos productos de IV gama contenían al menos dos HAAs en una concentración que variaba de $<0.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $24 \mu\text{g kg}^{-1}$, apoyando la transferencia de estos DBPs generados durante la etapa de lavado, hasta el producto final comercializado. Recientemente Zhang y col. (2022), analizaron un total de 33 DBPs generados durante las etapas de lavado, comparando distintos sistemas comerciales de lavado. Se analizaron

tanto DBPs regulados como emergentes en lechuga y col, así como en el agua de lavado. Los resultados mostraron distintas concentraciones de THMs y HAAs, atendiendo al sistema utilizado y al punto de recogida de muestra. Sin embargo, de entre los cuatro grupos de DBPs analizados, los HAAs y THMs representaron el segundo y cuarto grupo, respectivamente, en cuanto a su concentración en las muestras analizadas.

Respecto a la presencia de clorato en la industria agroalimentaria, Gil y col. (2016), analizaron la acumulación de este subproducto en el agua de lavado, así como los residuos en lechuga cortada de un procesador comercial, manteniendo unas concentraciones en el tanque de lavado de cloro libre y DQO entre 1-80 mg L⁻¹ y 1000-1500 mg L⁻¹, respectivamente. En estas condiciones, la acumulación de clorato en el agua de lavado fue alrededor de 19-45 mg L⁻¹, y en el producto de 4.5-5.0 mg kg⁻¹. Estos autores establecieron que los residuos de clorato en lechuga lavada correspondían aproximadamente al 10% de la concentración presente en el agua de lavado. Asimismo, Garrido y col. (2019), establecieron que la captación de clorato con respecto a la concentración de este subproducto en el agua de lavado depende del tipo de producto y del tamaño de corte, con una mayor acumulación en zanahoria rallada, seguido de brotes tiernos y lechuga rallada. Por otro lado, Tudela y col. (2019b) también analizaron residuos de clorato en agua de lavado y en producto vegetal proveniente de una planta procesadora que utilizaba Cl₂ combinado con NaOCl como agentes desinfectantes, mostrando una acumulación de este subproducto en agua de hasta 16 mg L⁻¹, y una concentración en producto mayor a 2 mg kg⁻¹.

La presencia de DBPs en efluentes procedentes de EDARs que van a utilizarse como agua de riego, cuando se utilizan tratamientos terciarios de desinfección basados en el cloro también es un tema de preocupación. Li y col. (2019) analizaron un total de 44 DBPs en efluentes clorados procedentes de distintas plantas de tratamiento, estableciendo

concentraciones medias de THMs y HAAs de $28 \mu\text{g L}^{-1}$ y $47 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, representando estos DBPs los grupos mayoritarios de todos los analizados. Asimismo, Zhang y col. (2021) analizaron los THMs de efluentes provenientes de plantas de tratamiento, aunque clorados posteriormente en laboratorio con NaOCl a distintas concentraciones de cloro libre ($2-8 \text{ mg L}^{-1}$), observando concentraciones de cloroformo que variaban según la concentración del desinfectante utilizada de 15 a $60 \mu\text{g L}^{-1}$. Otros DBPs, tales como el clorato, también se pueden acumular como un subproducto de degradación en los efluentes de las aguas residuales cloradas (Uzun y col., 2019; Zhong y col., 2019). Garrido y col. (2020) establecieron que el riego con agua regenerada clorada producía la acumulación de clorato en lechuga fresca, pudiendo sobrepasar el máximo nivel residual regulado por la CE para este producto (0.7 mg kg^{-1}), debido a la continua incorporación de clorato durante los procesos de riego. Estos autores demostraron que, a pesar de una concentración de clorato relativamente baja en el agua regenerada (0.2 mg L^{-1}), las lechugas regadas con estas aguas presentaron altas concentraciones de clorato (0.6 mg kg^{-1}), debido a la continua acumulación de estos subproductos a lo largo del ciclo de crecimiento de las plantas.

6.9. Metodologías de análisis para los DBPs: THMs, HAAs y clorato

Se han descrito diferentes técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de los DBPs, entre las que se incluye el uso de mediciones no específicas para la determinación de los DBPs totales en muestras de agua, mediante la determinación de los halógenos orgánicos totales (TOX). Este análisis combina la adsorción de la materia orgánica halogenada en una columna de carbón activo, la posterior pirólisis para formar haluros de hidrógeno y su determinación mediante una valoración coulombimétrica con plata, o incluso su medición mediante cromatografía iónica o utilizando analizadores

de halógenos orgánicos absorbibles (Urbansky y Magnuson 2002; Hua y Reckhow, 2006; Instrumentación Científica Yáñez [ICY], 2022).

Por otra parte, en cuanto a la determinación específica de los diferentes grupos de DBPs, la cromatografía de gases (GC) ha sido una de las principales técnicas de separación para los DBPs no polares, volátiles o semivolátiles, tanto con detectores por espectrometría de masas (MS), como con los de captura de electrones (ECD) (Richardson y Kimura, 2020; Wawryk y col., 2021). Asimismo, para utilizar esta metodología en analitos polares, hidrofílicos o térmicamente lábiles, se utiliza la derivatización química previa al análisis de la muestra por GC (Yang y col., 2019b). En cuanto a las técnicas de ionización utilizadas, la ionización por impacto electrónico es la más común en metodologías por GC-MS, produciendo una alta fragmentación de los compuestos, aunque también se pueden utilizar técnicas de ionización menos agresivas, tales como la ionización química. Ambas técnicas de ionización funcionan bien con DBPs de baja polaridad y volátiles. Otras técnicas de ionización, utilizadas principalmente en el acoplamiento de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS), serían la ionización química a presión atmosférica, la cual reduce la descomposición térmica aumentando la sensibilidad, o la fotoionización a presión atmosférica. Asimismo, tal como se ha mencionado anteriormente, la GC fue la primera metodología utilizada para la separación de los THMs que fueron los primeros DBPs descritos (Rook, 1974). La utilización de LC-MS ha sido una herramienta fundamental para la detección de una gran variedad de DBPs, especialmente polares, incluso de alto peso molecular y/o térmicamente lábiles, que no pueden ser analizados mediante GC. En este sentido, una gran cantidad de metodologías para el análisis de DBPs utilizan cromatografía en fase reversa y una fuente de ionización por electrospray (ESI). Igualmente, la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es la técnica cromatográfica más utilizada para analitos

altamente polares (Rubirola y col., 2019; Zhang y col., 2019b; Hua y col., 2020; Jiang y col., 2020; Wawryk y col., 2021). Por otra parte, las técnicas de separación por cromatografía iónica (IC) han sido ampliamente descritas para el análisis de DBPs, tales como HAAs o clorato (Mathew y col., 2009; Srivastav y col., 2020). Todo esto pone de manifiesto que no existe una metodología general para el análisis de los DBPs, debido a la gran variedad de compuestos existentes de muy distinta naturaleza. Por este motivo, es necesario seguir avanzando en el estudio de metodologías adecuadas, robustas, veraces y precisas para el análisis de los distintos tipos de DBPs, de manera que se avance en el conocimiento de su incidencia en las distintas matrices relacionadas con la industria agroalimentaria como es el agua de proceso, los productos frescos, y las aguas regeneradas para riego entre otras. El objetivo sería el controlar y prevenir que, en última instancia, estos subproductos estén presentes en los alimentos que consumimos por encima de los límites que puedan entrañar un peligro para la salud de la población. Seguidamente se describen las principales metodologías de análisis para los principales DBPs objeto del presente trabajo de Tesis: THMs, HAAs y clorato.

THMs

La primera técnica descrita para el análisis de THMs fue el pretratamiento de las muestras con la generación de espacio de cabeza, y su posterior separación mediante GC (Rook, 1974). Esta técnica permite la separación de los compuestos volátiles presentes en la muestra, los cuales se separan en la fase gaseosa que se encuentra en equilibrio con la matriz (tanto líquida como sólida) para su posterior análisis. La muestra se introduce en un vial cerrado herméticamente, dejando un volumen libre sobre la muestra. El vial se introduce en un horno, para que los compuestos volátiles se separen de la matriz, hasta que se establece el equilibrio entre las fases, inyectando posteriormente en el cromatógrafo

de gases los volátiles separados (Pérez-Antón, 2016). Aunque esta técnica requiere mayores cantidades de muestra para su análisis, sigue siendo considerada actualmente como un método fiable y robusto para el análisis de los THMs en aguas (Alexandrou y col., 2017; Srivastav y col., 2020). La USEPA ha publicado distintos métodos para el análisis de THMs en aguas. El Método 502.2 consiste en el análisis de compuestos orgánicos volátiles en aguas mediante un pretratamiento con la técnica de purga y trampa seguido de la separación de estos compuestos en una columna capilar y la posterior detección utilizando detectores de fotoionización y de conductividad electrolítica, actuando en serie (USEPA, 1995a). La técnica de pretratamiento mediante purga y trampa consiste en el espacio de cabeza dinámico en el que los compuestos volátiles son extraídos de la muestra mediante un flujo de gas inerte. Este gas pasará posteriormente por una trampa fría o un cartucho empacado con un material adsorbente, mediante el cual los THMs se transfieren a la columna por un proceso de desorción térmica (Pérez-Antón, 2016). Asimismo, el Método 524.2 es una variante del anterior, donde el detector final utilizado consiste en un espectrómetro de masas (MS) (USEPA, 1995b). Este método se ha utilizado para la detección de THMs en agua potable (Culea y col., 2006). En cambio, un tercer método publicado por la USEPA, el Método 551.1 utiliza un pretratamiento de la muestra consistente en una extracción líquido-líquido, seguido de una separación de los compuestos por GC en una columna capilar y su posterior detección utilizando un detector de captura electrónica (EDC) (USEPA, 1990). Dentro de los Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, se ha descrito para el análisis de THMs el Método 6232 B, consistente en una extracción líquido-líquido seguida de una separación por GC, el Método 6232 C consistente en un pretratamiento mediante purga y trampa y utilizando un detector MS tras la separación de los compuestos por GC, así como el método 6232 D, que también utiliza un pretratamiento mediante purga y trampa

(APHA, 2014). Igualmente, también se ha descrito una técnica de pretratamiento basada en la microextracción en fase sólida (SPME) del espacio de cabeza para el análisis de los THMs. Esta técnica se utiliza para extraer los compuestos volátiles del espacio de cabeza, utilizando una fibra de sílice fundida, recubierta con una fase estacionaria. Esta fibra se introduce en el vial que contiene la muestra, quedando los compuestos volátiles adsorbidos y siendo transferidos posteriormente al inyector y a la columna cromatográfica por desorción térmica (Pérez-Antón, 2017). Esta técnica continúa siendo ampliamente utilizada tanto en el análisis de THMs en aguas, aguas tratadas y recicladas, así como para aguas de proceso y producto vegetal fresco (Allard y col., 2012; Gómez-López y col., 2013).

HAAs

Uno de los principales métodos para el análisis de HAAs en agua potable fue publicado por la USEPA (Método 552.3) y consiste en la extracción líquido-líquido seguido de la separación de estos compuestos por GC y su detección mediante captura electrónica (ECD) (USEPA, 2003). Lee y col. (2018) modificaron esta metodología aplicándola a agua de proceso, aunque utilizando un detector por espectrometría de masas (MS). Sin embargo, la metodología publicada por la USEPA es algo tediosa y laboriosa, ya que requiere realizar un proceso previo de derivatización de los HAAs, incluyendo diferentes etapas para conseguir la correcta metilación de algunos de los HAAs. Serían Cardador y Gallego (2014), las investigadoras que adaptaron la metodología publicada por la USEPA, aunque en este caso desarrollaron una microextracción líquido-líquido para el análisis de los HAAs en agua, así aumentaron el volumen de inyección de la muestra utilizando una tecnología de inyección de gran volumen con temperatura de

valorización programada, acoplado a un GC-MS. De esta manera consiguieron desarrollar una metodología más rápida y sencilla, mejorando la sensibilidad y los límites de detección de estos compuestos en agua. Para el análisis de los HAAs en producto fresco, Lee y col. (2019) desarrollaron una extracción líquido-líquido y su posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (GC-MSD). Asimismo, Cardador y Gallego (2012) publicaron una metodología basada en la separación por espacio de cabeza y su posterior detección por GC-MS, utilizando dimetilsulfato para la derivatización de HAAs y lo aplicaron al análisis en frutas y hortalizas mínimamente procesadas.

Por otra parte, metodologías basadas en cromatografía líquida (LC) y fuente de ionización por electrospray (ESI) han sido muy utilizadas para el análisis de HAAs en agua potable (Zwiener y Richardson, 2005). La USEPA publicó el Método 557 para la determinación de HAAs en agua potable mediante cromatografía iónica con ionización por electrospray y acoplado a espectrometría de masas en tándem (IC-ESI-MS/MS) (USEPA, 2009), habiendo sido posteriormente ampliado y mejorado o incluso acoplado a diferentes espectrómetros de masas (Bruzzoniti y col., 2019; Huang y Rohrer, 2020; Zhang y col., 2020b). La cromatografía líquida en fase reversa ha sido aplicada para el análisis de los HAAs en agua, así como la aplicación de diferentes técnicas para mejorar la retención y la separación de estos compuestos, tales como la utilización de reactivos de par iónico o técnicas de pretratamiento basadas en extracción en fase sólida (Takino y col., 2000; Loos y Barceló, 2001; Prieto-Blanco y col., 2012; Luo y col., 2013). Las técnicas basadas en LC-ESI-MS/MS son metodologías seguras, robustas y rápidas que han sido muy aplicadas para el análisis de los HAAs (Meng y col., 2010; Duan y col., 2011; Planas y col., 2019; Postigo y col., 2020). Sin embargo, estas técnicas no han sido utilizadas para agua de proceso o para producto fresco.

Clorato

Para el análisis de este DBP inorgánico, tanto en aguas como en muestras sólidas, la USEPA publicó el Método 300.1 basado en cromatografía iónica (IC) acoplada a un detector de conductividad (USEPA, 1993), siendo uno de los métodos más utilizados para el análisis de clorato en muestras de agua. Asimismo, la utilización de IC acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) también ha sido previamente utilizada para el análisis de clorato en agua (Charles y Pépin, 1998). Sin embargo, la aplicación de esta metodología a otro tipo de matrices, tales como tejidos vegetales frescos, ha sido menos investigada (McCarthy y col., 2018). La UE, a través de los Laboratorios de Referencia para Residuos de Pesticidas, publicó una metodología basada en LC-MS/MS para el análisis de pesticidas polares en alimentos vegetales (QuPPE), entre los que incluía el clorato (Anastassiades y col., 2021). Esta metodología fue referenciada por la EFSA en la opinión científica que publicó sobre el riesgo de la presencia de clorato en alimentos (EFSA, 2015). Asimismo, las metodologías basadas en LC-MS/MS también han sido utilizadas para el análisis de clorato en aguas, así como en soluciones de hipoclorito (Li y George, 2005; Pisarenko y col., 2010; Stanford y col., 2013; Alfredo y col., 2015).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

El gran consumo de agua y la generación de grandes volúmenes de aguas residuales constituye uno de los principales problemas de la industria agroalimentaria, tanto desde el punto de vista medioambiental y de optimización de recursos, como desde el económico. La aplicación de prácticas seguras y adecuadas para la optimización de los recursos hídricos en los diferentes sectores de la industria agroalimentaria, desde la producción al procesado de los alimentos, resulta imprescindible para una gestión sostenible de los mismos, siendo respaldada por los principales organismos internacionales. El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la gestión y reutilización de las aguas en el sector agroalimentario. Esta Tesis Doctoral profundiza en el conocimiento sobre la gestión de aguas en distintos sectores agroalimentarios, como es el caso del procesado de alimentos vegetales frescos dentro del sector hortofrutícola, el procesado y la obtención de proteína vegetal en la industria alimentaria y las aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y que son destinadas al riego agrícola. En primer lugar, se ha estudiado la gestión de las aguas de proceso, para permitir su reutilización en la línea de proceso (lavado de mayor cantidad de producto vegetal usando el mismo volumen de agua) o en otros puntos de la línea, mediante la optimización del proceso de desinfección como paso indispensable en el lavado. En esta temática se ha profundizado en la influencia de la materia orgánica presente en el agua y procedente de distintos productos vegetales y las interferencias que ésta y otros agentes ocasionan en los sensores y métodos de medida, en particular en la medida de las concentraciones residuales de ácido peracético (PAA) y de cloro libre en el agua de lavado. Igualmente, se han caracterizado las aguas de proceso generadas durante el aislado de proteínas vegetales, para su reutilización y como fuente de obtención de subproductos de valor añadido. También se ha estudiado el posible riesgo químico de formación y acumulación de subproductos de

desinfección (DBPs), en particular, trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) y clorato, con el uso de desinfectantes clorados en agua de proceso y en producto vegetal, o durante los tratamientos terciarios en las EDARs que utilizan de forma individual o combinada cloro, UV-C y PAA, con la finalidad de evaluar la posible acumulación de DBPs en las aguas regeneradas destinadas al riego de cultivos. Para la determinación de estos DBPs, se ha desarrollado y validado una metodología para el análisis de HAAs.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se ha alcanzado mediante los siguientes objetivos específicos:

- 1. Estudio comparativo de diferentes sensores comerciales y métodos analíticos de medida para la dosificación de los desinfectantes ácido peracético (PAA) y cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl) empleados en la etapa de lavado.** Para este estudio se ha utilizado agua de lavado con y sin materia orgánica procedente de los exudados del corte tras el procesado en fresco de distintos vegetales, así como el agua de proceso del lavado de otros productos frescos enteros. Se ha estudiado las interferencias que la materia orgánica y otros compuestos pueden ocasionar en las medidas de los residuales de PAA y cloro, con diferentes sensores y metodologías de medida, comparando aguas de lavado de distintos productos. De esta forma, se han seleccionado las metodologías más adecuadas para la monitorización del proceso de desinfección. También se han estudiado los parámetros críticos para el control de la desinfección del agua de lavado (**Capítulo IV**).
- 2. Optimización y validación de una metodología adecuada para la detección y cuantificación de subproductos de desinfección, ácidos haloacéticos (HAAs), en producto vegetal fresco cortado y en su agua de lavado.** En este estudio se

ha utilizado como modelo la lechuga icerberg fresca cortada. La determinación de 9 HAAs se ha realizado mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) acoplada a un detector por espectrometría de masas mediante el monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La validación de esta metodología se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la guía SANTE de “Procedimientos para el control de la calidad analítica y la validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos” (SANTE, 2019) (**Capítulo V**).

3. Influencia de los reguladores de pH empleados en la desinfección con cloro en la generación de cloro gas y en la formación de los subproductos de desinfección (DBPs): cambios en las características físico-químicas y microbiológicas del agua de lavado. Se ha estudiado la influencia de diferentes reguladores de pH, incluido el ácido cítrico como ácido orgánico y otros ácidos inorgánicos como el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido carbónico, en la generación de DBPs clorados y en la formación de las dos especies de cloro en agua, el ácido hipocloroso (HOCl) y el ión hipoclorito (OCl⁻). Para lograr este objetivo, se ha determinado para cada uno de los reguladores, el rango de pH óptimo que maximiza la concentración de HOCl y, en consecuencia, su capacidad desinfectante. Igualmente, se ha estudiado la posible implicación del ácido cítrico en la emisión de cloro gas (**Capítulo VI**).

4. Estudio de la influencia de los tratamientos terciarios de desinfección con cloro, ácido peracético (PAA), UV, cloro/UV y PAA/UV en la formación de subproductos de desinfección, DBPs (trihalometanos, ácidos haloacéticos y

clorato) en aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y destinadas al riego agrícola. Para la reutilización de las aguas regeneradas se ha realizado el análisis comparativo de los DBPs generados tras el tratamiento terciario en 15 EDARs de la Región de Murcia, mediante el muestreo durante 13 semanas consecutivas entre los meses de junio a diciembre con el objetivo de la sustitución de aquellas tecnologías de desinfección que ocasionen la acumulación de DBPs por aquellas que los prevengan para la utilización de las aguas regeneradas para riego agrícola (**Capítulo VII**).

5. Estudio de la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la obtención de proteína vegetal y de su tratamiento con el fin de revalorizar su aprovechamiento y de reducir el impacto del vertido al medio ambiente. Se ha realizado la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la extracción proteica húmeda (alcalina y ácida), utilizando harina de haba (*Vicia faba*) y guisante (*Pisum sativum*). Se ha llevado a cabo la caracterización físico-química y el estudio de metodologías como la filtración por membrana para su tratamiento y reutilización, así como el estudio en la obtención de subproductos de valor añadido, tales como polifenoles y azúcares. Los parámetros analizados en las aguas residuales se han comparado en función el tipo de extracción (ácida y alcalina), la secuencia en la etapa de extracción (primera y segunda etapa), así como el tipo de matriz utilizada (harina haba y guisante). Este objetivo se ha llevado a cabo en colaboración con el Departamento de Agricultura y Alimentos (Research Institutes of Sweden, RISE), Gotemburgo (Suecia) (**Capítulo VIII**).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

1. PATRONES Y REACTIVOS

2-([3-{2-[4-Amino-2-(metilsulfanil)fenil]-1-diazenil}fenil]sulfonil)-1-etanol(ADS)(>99%)2-([3-{2-[4-Amino-2-(metilsulfoxi)fenil]-1-diazenil}fenil]sulfonil)-1-etanol (ADSO) (>99%) (GiottoBiotech, Florencia Italia). Patrón mezcla de (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ácido monocloroacético (MCAA) (98.1%), monobromoacético (MBAA) (98.1%), dicloroacético (DCAA) (98.5%), dibromoacético DBAA (100%), tricloroacético (TCAA) (99.9%), tribromoacético (TBAA) (99.7%), bromocloroacético (BCAA) (98.3%), clorodibromoacético (CDBAA) (98%), bromodicloroacético (BDCAA) (99.6%) (Material certificado de referencia EPA 552.2, Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Patrones internos marcados isotópicamente de HAAs: ácido monocloroacético-2-13C (MCAA-13C) (99%), ácido monobromoacético-1-13C (MBAA-13C) (99.5%), ácido dicloroacético-2-13C (DCAA-13C) (99.9%), ácido tricloroacético-2-13C (TCAA-13C) (99%) (1000 mg L^{-1}) (Dionex, Thermo Scientific, California, Estados Unidos) y ácido dibromoacético-1-13C (DBAA-13C) (99%) (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Patrón mezcla de trihalometanos (THMs) (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) triclorometano (TCM) (99.9%), bromodiclorometano (BDCM) (97.2%), clorodibromometano (CDBM) (96.5%), tribromometano (TBM) (96.1%) (Material certificado de referencia EPA 501/601, Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). 1-bromo-3-chloropropano (99%) (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Clorato (1000 mg L^{-1}) (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Patrón interno marcado isotópicamente de clorato ($\text{Cl}^{18}\text{O}_3^-$) (EU-reference laboratory). Ácido gálico monohidratado ACS ($\geq 98.0\%$) (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Patrones de polifenoles: quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico, rutina, ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Solución estándar de

hipoclorito de sodio (6-14% de cloro activo) (Supelco, Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

Acetonitrilo optima grado LC/MS (99.99%) (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, Estados Unidos). Ácido acético glacial ($\geq 99.7\%$) (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Ácido fórmico 98% para análisis, ACS, ISO (Panreac Applichem, ITW Reagents, Darmstadt, Alemania). Metil tert-butil eter (99.8%) (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Tiosulfato de sodio pentahidratado, grado reactivo (Scharlab, Barcelona, España). Metanol grado LC-MS ($\geq 99.8\%$) (J.T. Baker, Avantor Materials, Estados Unidos). Ácido clorhídrico en agua (32%) FCC (Merck, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Hidróxido de sodio (EMPROVE® ESSENTIAL, Merck, Darmstadt, Alemania). Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu (MP Biomedicals, Valiant Co. Ltd., China). 2,2-Difenil-1-picrilhidracil (radical libre) (95%) (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Kandel, Alemania). Etanol absoluto, ACS ($\geq 99.8\%$) (AnalaR NORMAPUR® VWR, West Chester, Pennsylvania, Estados Unidos). Tampón de lisis AVL (Qiagen, Hilden, Germany). Paraformaldehído (20%) (Electron Microscopy Science, Hatfield, Inglaterra). Ácido cítrico monohidratado (99.0–102.0%) (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Solución tampón pH 7.00 (fosfato) estándar NIST lista para su uso para la medición de pH (Fisher Chemical, Nuevo Hampshire, Estados Unidos). Solución estándar de óxido de fenilarsina (PAO) (0.00564N) (Hach, Iowa, Estados Unidos). Sulfato de N, N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (99%) (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Ácido ortofosfórico (85%) (Panreac AppliChem GmbH, Darmstadt, Alemania). Ácido sulfúrico (95–97%) (Merck, Darmstadt, Alemania). Ácido carbónico generado disolviendo directamente dióxido de carbono en agua ($>99.9\%$) (Linde Gas S.A.U., Valencia, Spain). Hipoclorito de sodio con 30 g L⁻¹ de cloro libre (Industrias

Gamer, Murcia, España) (**Capítulos IV y VI**). Hipoclorito de sodio con 10–20% de cloro libre (NewChem, SL, Alicante, España (**Capítulo VII**). Solución PAA Citroicide Plus, PAA (15%) + ácido acético (17%) + H₂O₂ (23%) (Productos Citrosol SA, Spain) (**Capítulo IV**). Solución commercial de PAA (15%) + ácido acético (16%) + H₂O₂ (24%) (Brenntag, Essen, Germany) (**Capítulo VII**). Agua ultrapura tipo 1 purificada en el laboratorio usando un sistema de purificación de agua MilliQ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

2. GENERACIÓN DEL AGUA DE LAVADO

Para llevar a cabo los estudios realizados en los **Capítulos IV y VI**, se generaron distintos tipos de agua de lavado de productos frescos enteros y cortados, en función del estudio llevado a cabo, con el objetivo de conseguir aguas de lavado con características similares a las generadas en líneas comerciales de manipulación y procesado. Para ello, se seleccionaron cuatro tipos de productos vegetales enteros (manzanas ‘Royal Gala’, tomates ‘Daniela’, pimientos rojos ‘California’ y limones ‘Verna’). Para simular los daños que pueden sufrir durante el lavado por caídas desde distintos niveles, estos productos se lanzaron individualmente desde una altura aproximada de 2 m a un contenedor de plástico. Se utilizaron alrededor de 22.5 kg de cada producto en 15 L de agua del grifo. Cada producto junto con el agua se agitó ligeramente y se dejaron durante 72 h a T^a ambiente (**Capítulo IV**). De esta forma, se pudo generar agua de lavado para cada producto rica en materia orgánica procedente del lavado de la superficie y del exudado de los frutos por los golpes ocasionados en la manipulación.

También se generó agua de lavado utilizando distintos productos frescos cortados. Para ello, se eliminaron las hojas externas de las cabezas de lechuga iceberg (*Lactuca*

sativa L) y se cortaron en trozos de 30 mm (L30) (**Capítulo VI**) o de 6 mm de ancho (L6), utilizando un cuchillo afilado de acero inoxidable. La col lombarda y el repollo también se cortaron en trozos de 6 mm (**Capítulo IV**). Para la generación del agua de lavado, los productos cortados se sumergieron en agua del grifo en diferentes proporciones, atendiendo al producto estudiado, con la finalidad de obtener un agua con una alta concentración de materia orgánica procedente principalmente del exudado de los tejidos cortados. Para ello se tomó un volumen aproximado de 8 L de agua del grifo y, para cada producto, se realizaron tres lavados sucesivos de unos 20 minutos cada uno. El agua generada fue almacenada a una T^a de 4 °C y utilizada en un período inferior a 24 h. Como paso previo a la realización de todos los ensayos, las aguas se filtraron con una malla de poliamida de tamaño de poro de 0.25 mm, antes de realizar la determinación del contenido en materia orgánica.

3. DESINFECCIÓN DEL AGUA DE LAVADO

La desinfección del agua de lavado se llevó a cabo en una planta piloto utilizando un sistema dinámico tal y como describió Gómez-López y col. (2014). Este sistema simula un tanque de lavado de una planta comercial donde la materia orgánica va aumentando gradualmente debido a la continua entrada de agua de lavado en el tanque (**Figura 3.1**). El sistema cuenta con un tanque de lavado (6 L), que inicialmente contenía agua sin materia orgánica, y con el desinfectante ajustado a la concentración requerida. Este sistema dinámico también cuenta con un depósito para el agua de lavado generada, con un sistema de agitación, así como una bomba para la entrada continua del agua de lavado al tanque, con un flujo de 6 L h⁻¹, de manera que la materia orgánica en el mismo va ascendiendo gradualmente. La dosificación del desinfectante se realizó de forma manual, tras la medida del residual y el ajuste de la concentración objetivo. Este sistema

también tiene un sistema de refrigeración, una bomba para la recirculación de agua en el tanque, un panel de control y una sonda multiparamétrica para la medida de temperatura, pH, conductividad eléctrica (CE) y potencial de oxidación-reducción (ORP).

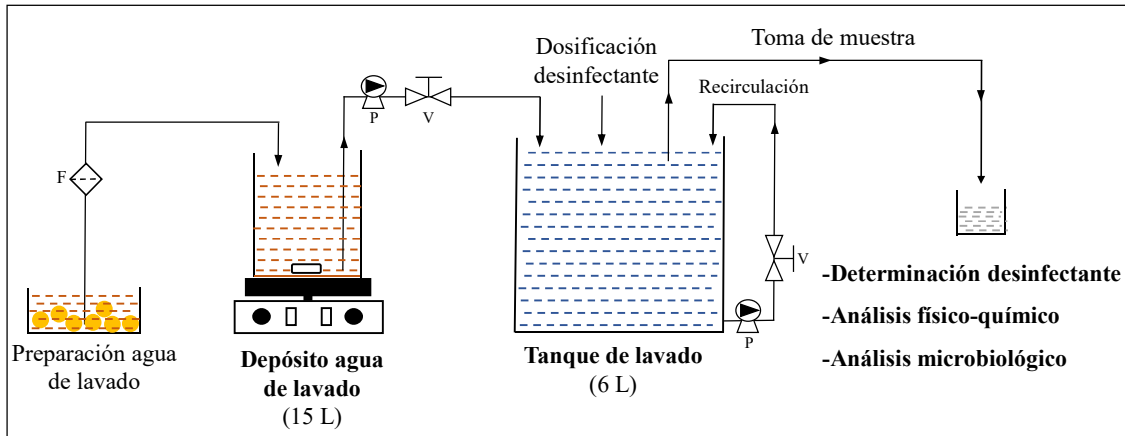


Figura 3.1. Sistema dinámico simulando tanque de lavado de una línea comercial de producto fresco.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se realizaron varios tipos de ensayos:

- **En el estudio comparativo de diferentes sensores y métodos analíticos de medida para la dosificación de PAA (Capítulo IV)**, se realizaron dos ensayos por cada uno de los productos (manzana, tomate, pimiento y limón). El sistema dinámico permitía la entrada constante de agua de lavado a un tanque que inicialmente contenía agua del grifo con, aproximadamente, 200 mg L^{-1} de PAA. Durante los 120 min que duró cada uno de los ensayos, la concentración de desinfectante fue ajustada continuamente de forma manual. Se tomaron tres muestras del tanque de lavado a diferentes intervalos de tiempo (cada 15 min) para la comparación de las metodologías de cuantificación de la concentración residual de PAA. Para la determinación de la materia orgánica presente en el agua de lavado, se realizó la medida del carbono orgánico total (COT), excepto en el agua de lavado

de pimienta, donde se utilizó la DQO debido a las interferencias que los exudados del pimienta causaron en las determinaciones de COT. Asimismo, se realizó la determinación de los parámetros físico-químicos pH, ORP, CE y T^a. Los ensayos se realizaron a T^a ambiente.

- **En el estudio comparativo de diferentes sensores y métodos analíticos de medida para la desinfección con cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl) (Capítulo IV)**, se realizaron dos ensayos para cada uno de los productos cortados (lechuga, col y cebolla). Durante los ensayos en el sistema dinámico, la concentración de cloro libre en el tanque de lavado se mantuvo aproximadamente en 20 mg L⁻¹. Esta concentración fue ajustada manualmente durante la entrada del agua de lavado en el tanque. Asimismo, el pH se ajustó a 5.5 con 1 M de ácido fosfórico y la T^a se mantuvo a 5 °C. Durante los 120 min que duró cada ensayo, se recogieron tres muestras del tanque de lavado a diferentes intervalos de tiempo (cada 30 min) para la comparación de las diferentes metodologías en la determinación de la concentración de cloro libre. La determinación de la materia orgánica, se realizó mediante la medición de la DQO. Igualmente, se determinaron parámetros físico-químicos como pH, ORP y T^a. Por último, la comparación de sensores y métodos analíticos de medida para la desinfección con cloro también se realizó en agua sin materia orgánica (agua sin demanda de cloro), en las mismas condiciones que las indicadas anteriormente, pero en este caso sin la utilización del sistema dinámico.
- **En el estudio de la influencia de los reguladores de pH empleados en la desinfección con cloro (Capítulo VI)**, se realizaron cuatro ensayos, uno para cada

uno de los reguladores (ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico), utilizando agua de lavado de lechuga cortada, a una concentración de cloro libre de 25 mg L⁻¹, el pH ajustado a 5.5 y la T^a controlada de 10-12 °C. Durante los 120 min que duró cada ensayo, se tomaron tres muestras del tanque de lavado a diferentes intervalos de tiempo (cada 30 min) para la determinación de la materia orgánica mediante el análisis de la DQO. Asimismo, las muestras tomadas fueron neutralizadas con 3 M de tiosulfato de sodio, para la determinación de la calidad microbiológica mediante el recuento de bacterias mesófilas aerobias totales (TAB), así como para el análisis de los DBPs (THMs, HAAs y clorato).

4. MUESTREOS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARs)

Para el estudio sobre la formación de DBPs en aguas procedentes de EDARs (**Capítulo VII**), se recogieron muestras de 15 EDARs ubicadas en varias localidades de Murcia (España), siendo 4 de ellas depuradoras de grandes zonas urbanas (B, E, F y L) y 11 de localidades de menor tamaño (A, C, D, G, H, I, J, K, M, N, O). Desde junio a diciembre de 2020, las depuradoras de menor tamaño fueron muestreadas una vez al mes y las de mayor tamaño lo fueron dos veces al mes, tomando muestras tanto del influente a la entrada de las depuradoras, como del efluente a la salida tras los tratamientos terciarios. La caracterización físico-química de las aguas la realizó la compañía explotadora de la EDAR (Acciona Agua, S.A.U) e incluyó pH, CE, DQO y, dependiendo del sistema de desinfección utilizado, dosis de NaOCl o de PAA aplicado. Para el análisis de los DBPs, las muestras fueron alicuotadas en botellas de vidrio ámbar sin espacio de cabeza y transportadas bajo refrigeración al CEBAS-CSIC, para el análisis de THMs

inmediatamente después de su recepción, mientras que para el análisis de HAAs y clorato permanecieron en refrigeración y se analizaron dentro de las 24 h siguientes al muestreo.

4.1. Inactivación microbiológica de las muestras de agua

Debido a que los muestreos de las aguas residuales se realizaron durante la pandemia de COVID-19 y con la finalidad de evitar cualquier riesgo microbiológico derivado de la presencia potencial del virus SARS-CoV-2 en los influentes de las aguas muestreadas, se estudió la aplicación de un protocolo de inactivación previo al análisis de los DBPs y su efecto en la cuantificación de los mismos. El estudio consistió en comprobar la interferencia o no del protocolo de inactivación en los DBPs. Para ello, se compararon dos protocolos de inactivación utilizando aguas de efluentes correspondiente a cinco EDARs, con distintos tratamientos de desinfección (cloro, PAA, UV, cloro/UV, PAA/UV), para prevenir cualquier riesgo microbiológico durante este estudio. Se realizaron tres muestras de agua por cada tratamiento de desinfección y protocolo de inactivación. Los protocolos estudiados fueron los siguientes:

- **Método basado en un protocolo de adición de fenol e isotiocianato de guanidina** (Darnell y col., 2004; Bain y col., 2020). Las muestras de agua fueron centrifugadas (2500 xg, 10 min) y el sobrenadante filtrado con filtros de poliétersulfona (PES) de tamaño de poro de 0.45 μm . Seguidamente, se adicionó un tampón de lisis AVL a la muestra de agua, en una proporción 40:1 (volumen/volumen). Posteriormente, las muestras se dejaron reposar durante 1-5 min y se llevaron al laboratorio de análisis para la determinación de los DBPs.

- **Método basado en la adición de paraformaldehído (PFA)** (Kumar y col., 2015).

Se realizaron los pasos iniciales de centrifugación y filtrado coincidentes con los del método anterior. Seguidamente, se diluyeron las muestras en PFA hasta alcanzar una concentración final de 4% de PFA. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min y se llevaron al laboratorio para el análisis de los DBPs.

5. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE HARINA DE HABA Y GUISANTE Y OBTENCIÓN DE LAS AGUAS DE PROCESO

Para llevar a cabo el estudio de las aguas de proceso derivadas de la obtención de aislados de proteína vegetal (**Capítulo VIII**), el material utilizado para la extracción de proteína consistió en harina de haba (*Vicia faba*) y de guisante (*Pisum sativum*) suministrada por agricultores locales suecos (Västra Götaland, Suecia).

Para ello, se realizó una extracción húmeda, tanto ácida como alcalina, basadas en el protocolo de Swanson (1990), con ligeras modificaciones. La extracción alcalina se llevó a cabo mezclando 25 g de harina con agua ultrapura en una relación 1:15 (peso/volumen), ajustando el pH a 9.5 con 1 M de NaOH y agitando la mezcla durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla se centrifugó (3400 rpm durante 15 min) y el sobrenadante se recuperó. Seguidamente, se ajustó el pH (4.5) del mismo con 0.5 M de HCl, para conseguir la precipitación de las proteínas según su punto isoeléctrico, ya que es cuando presenta su mínima solubilidad y por tanto precipita. La mezcla se centrifugó (3400 rpm durante 15 min), separando el aislado proteico del sobrenadante acuoso. Este sobrenadante se recogió como la primera fracción de agua de la extracción alcalina (1ª fracción de agua), para su posterior caracterización. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de lavado del precipitado proteico, mezclando éste con agua ultrapura en una

proporción 1:10 (peso/volumen) y agitando la mezcla durante 5 min. Seguidamente, se centrifugó la mezcla (3400 rpm durante 15 min) y el sobrenadante recogido se designó como la segunda fracción de agua de la extracción alcalina (2ª fracción de agua), mientras que el precipitado constituyó el aislado final de proteína vegetal (**Figura 3.2**).

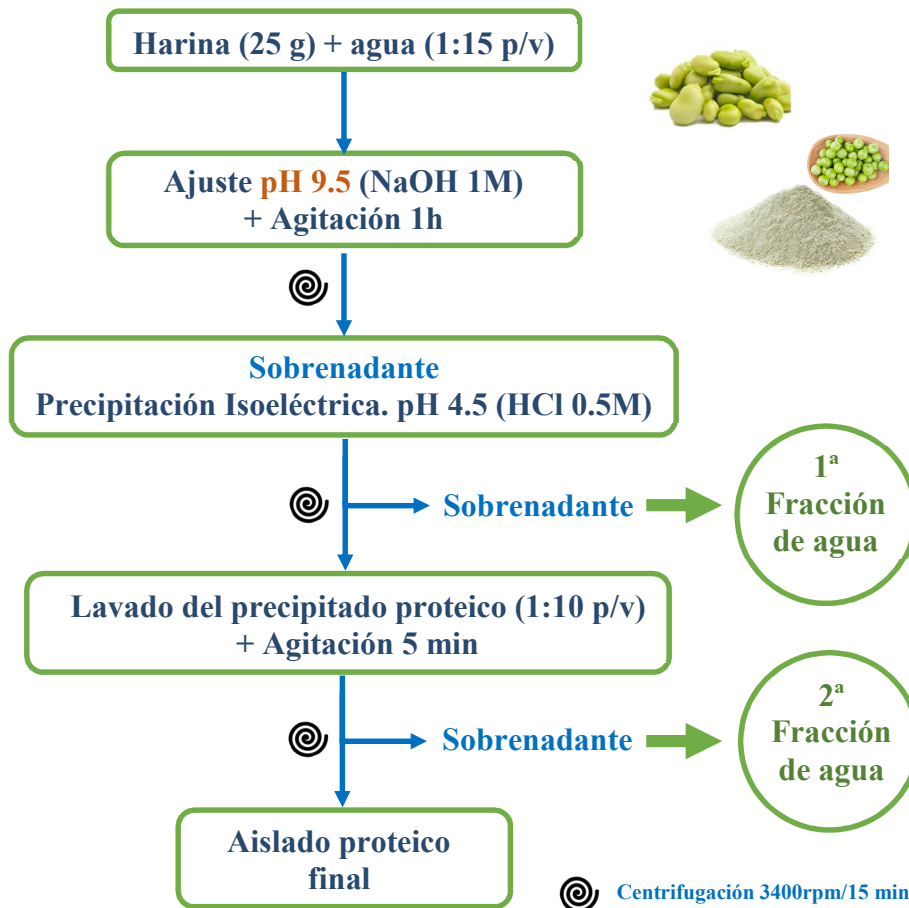


Figura 3.2. Proceso de extracción alcalina de proteínas de harina de haba y guisante.

La extracción ácida se llevó a cabo mezclando, progresivamente, 25 g de harina con agua ultrapura acidificada con 0.5 M de HCl (relación 1:15, peso/volumen), manteniendo el pH estable (pH 2.5) durante 1 hora de agitación. El resto de pasos fueron similares a los de la extracción alcalina, con la única diferencia que se utilizó 1 M de NaOH para ajustar el pH hasta el punto isoelectrico de las proteínas (pH 4.5) (**Figura 3.3**).

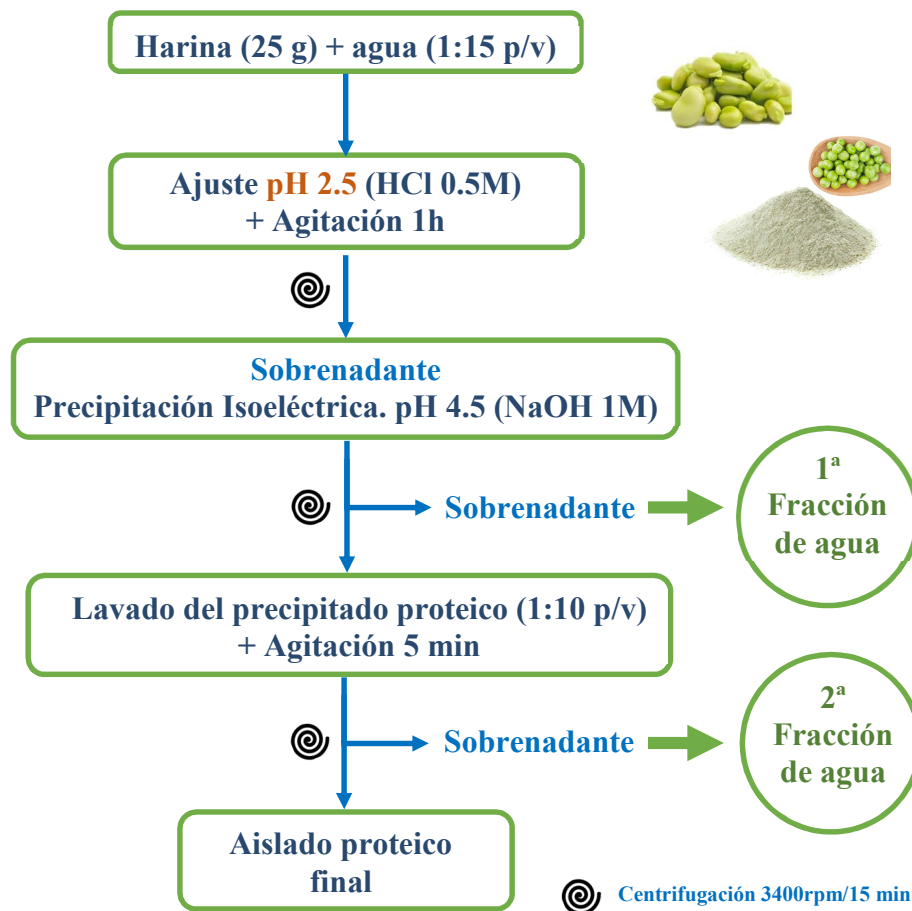


Figura 3.3. Proceso de extracción ácida de proteínas de harina de haba y guisante.

Se obtuvo un total de 8 fracciones de aguas, atendiendo a la matriz utilizada (harina de haba y guisante), tipo de proceso de extracción (extracción alcalina y ácida) y etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de agua).

Atendiendo al parámetro estudiado en la caracterización de las aguas, se utilizó un número diferente de réplicas de las fracciones recogidas. Estas fracciones fueron, en primer lugar, caracterizadas con los parámetros físico-químicos como DQO, ST, SDT, CE, pH y turbidez. Asimismo, fueron posteriormente filtradas con la finalidad de evaluar diferentes tecnologías de membrana para el tratamiento de las aguas. Se utilizaron filtros de 0.2 μm y 0.1 μm de tamaño de poro (Acrodisc Pall, Nueva York, estados Unidos). Posteriormente, se determinó los parámetros de sólidos totales (ST), sólidos disueltos

totales (SDT), CE y pH de las aguas filtradas por 0.2 μm y por 0.1 μm . La DQO y la turbidez también se determinaron en aquellas filtradas por 0.2 μm . Asimismo, se evaluó la presencia de compuestos de alto valor añadido en las fracciones de agua recogidas, mediante determinaciones tales como el contenido en proteínas, carbohidratos, el perfil polifenólico, así como la cuantificación de compuestos fenólicos individuales y totales y la actividad antioxidante.

6. CARACTERIZACIÓN DE LAS AGUAS

6.1. Análisis físico-químico y microbiológico

Se determinaron los parámetros como la T^a , ORP, pH y CE utilizando una sonda multiparamétrica portátil (sensION MM150, Hach, Iowa, Estados Unidos). Los resultados para T^a , ORP y CE se expresaron en $^{\circ}\text{C}$, mV y mS cm^{-1} , respectivamente. Las determinaciones de DQO y COT se realizaron con los métodos fotométrico estándar (5220 y 5310) (APHA, 2014), utilizando un espectrofotómetro (Spectroquant, NOVA60, Merck, Darmstadt, Alemania). Los resultados se expresaron en mg L^{-1} . La turbidez se midió utilizando un turbidímetro (Turbiquant IR, Merck, Darmstadt, Alemania), y los resultados expresados en UNT. Los ST fueron determinados mediante el método estándar 2540B (APHA, 2014) y los resultados se expresaron en g L^{-1} . Los SDT se determinaron utilizando un refractómetro digital (HI 96801, Hanna Instruments, Estados Unidos), y los resultados se expresaron en $^{\circ}\text{Brix}$. En cuanto a las determinaciones microbiológicas, la presencia de bacterias aerobias totales se determinó mediante recuento en placa de agar (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona) incubado a 30°C durante 36-48 horas (López-Gálvez y col., 2019). Los resultados se expresaron en $\log \text{UFC}/100\text{mL}$.

6.2. Análisis de compuestos de valor añadido

El contenido en proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). El contenido en carbohidratos se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Merck Hitachi, Alemania) acoplada a un detector de índice de refracción (IR) (Elite LaChrom VWR Hitachi L-2490). Previamente, las muestras de agua se filtraron a través de un filtro de 0.22 μm de tamaño de poro (PES, Sartorius Minisart). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna C8 (Phenomenex Rezex RHM-Monosaccharide, 300 mm \times 7.80 mm, 8 microns, 00H-0132-K0). La fase móvil consistió en agua ultrapura en un gradiente isocrático a un flujo de 0.5 mL min^{-1} . El volumen de inyección de 20 μL y el tiempo total de análisis fue de 25 min. En ambos casos, los resultados se expresaron en mg L^{-1} . Asimismo, el contenido en compuestos fenólicos totales se determinó mediante el ensayo Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), utilizando ácido gálico para la cuantificación y expresando el contenido como mg de ácido gálico equivalentes (mg GAeq).

El perfil de compuestos fenólicos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de diodos (DAD) UV-VIS y acoplado en serie a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones a través de una interfase de ionización por electrospray (HPLC-DAD-ESI-IT (MS^n)) (**Fotografía 3.1**).



Fotografía 3.1. HPLC-DAD-ESI-IT (MSn) 1200 series (Agilent).

Previo al análisis, las muestras de agua se concentraron mediante una extracción en fase sólida, utilizando cartuchos C18 (Chromafix C18 ec cartridge S, Macherey-Nagel, Alemania). Para ello, se filtraron 10 mL de muestra a través del cartucho, tras su activación previa con metanol (0.5 mL). La fracción fenólica fue retenida en el cartucho y posteriormente eluida con metanol (0.5 mL) y filtrada con un filtro de 0.22 μm . Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos (HPLC 1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba binaria, un automuestreador, un desgasificador y un detector DAD, y acoplado en serie con un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (Esquire, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El sistema se controlaba utilizando el software ChemStation (Agilent, v.08.03). La separación cromatográfica se realizó en una columna C18 (Agilent Pursuit XRs 100 \AA , 250 mm \times 4 mm, 5 μm tamaño de partícula) que operó a temperatura ambiente. Como fases móviles se utilizó agua con 1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo (B), a un flujo de 0.8 mL min^{-1} y la siguiente elución por gradiente: 0 min, 3% B, de 0 a 5 min, 3-9% B, de 5-15 min, 9-16% B, 15-50 min, 16-50% B, 50-52 min, 50-90% B, volviendo finalmente a las condiciones cromatográficas iniciales en a los 57 minutos y

equilibrando en estas condiciones hasta los 62 minutos. El volumen de inyección fue de 20 μL . Los cromatogramas se registraron a las λ de 280, 320, 340, 360 y 520 nm. En cuanto a las condiciones del espectrómetro de masas, se utilizó nitrógeno como gas de nebulización y de secado en la fuente de ionización a una presión de 65 psi, un flujo de 11 L min^{-1} y una temperatura de 350°C. El voltaje del capilar se mantuvo en 4 kV. Los espectros se adquirieron en modo de ionización negativo con un rango de masas de 50-1200 m/z . Se trabajó en modo AutoMSn, obteniendo en cada barrido los perfiles de fragmentación MS/MS de los tres iones más intensos, aplicando un voltaje de fragmentación de 1V. Los compuestos se identificaron teniendo en cuenta su orden de elución en HPLC, su espectro UV, su masa y su perfil de fragmentación MS/MS. La cuantificación se llevó a cabo en UV utilizando los estándares disponibles de cada familia de polifenoles. Se prepararon dos grupos de patrones, 1) quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido hidroxibenzoico; 2) rutina y ácido p-coumárico. Los resultados se expresaron en mg L^{-1} .

La determinación de la actividad antioxidante se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brand-Williams y col. (1995), con ligeras modificaciones, calculando para ello la concentración efectiva media (EC50) (Kagliwal y col., 2011), representando ésta la concentración de extracto que da lugar a una reducción del 50% en la absorbancia del DPPH (radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo). Cuanto menor es el valor de EC50, mayor es la actividad antioxidante.

7. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DESINFECTANTES EN EL AGUA DE LAVADO

7.1. Métodos para el análisis del PAA

Para el estudio comparativo de los diferentes sensores y métodos analíticos de medida del residual de PAA (**Capítulo IV**), se utilizaron las cuatro metodologías que se describen a continuación. En todas ellas, la concentración de PAA se expresó en mg L^{-1} :

- **Análisis por HPLC-DAD.** La determinación del PAA en el agua de lavado se realizó por HPLC-DAD, utilizando el protocolo previamente descrito en agua potable (Effkemann y Karst, 1998) y adaptado para agua de proceso. Esta metodología se basa en la determinación indirecta de la concentración de PAA mediante la oxidación cuantitativa de una sustancia colorimétrica (ADS) por la acción del PAA, el cual oxida el grupo sulfuro de este compuesto al correspondiente sulfóxido (ADSO) (**Figura 3.4**) y la posterior separación y detección del compuesto ADSO por HPLC-DAD. Para ello, a la muestra de agua de lavado, previamente filtrada por un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Minisart, PES, Sartorius, Gottingen, Alemania), se le añadió 1mM de ADS y 100mM de ácido acético. Se dejó reaccionar a una T^{a} de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min , bajo una ligera agitación (1200 rpm), para posteriormente ser analizada mediante HPLC-DAD.

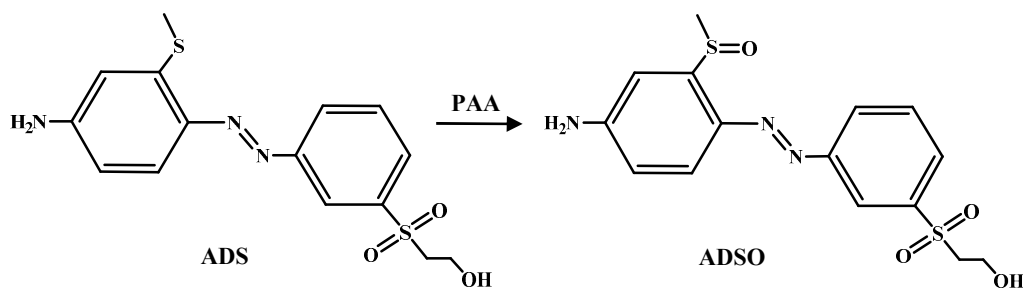
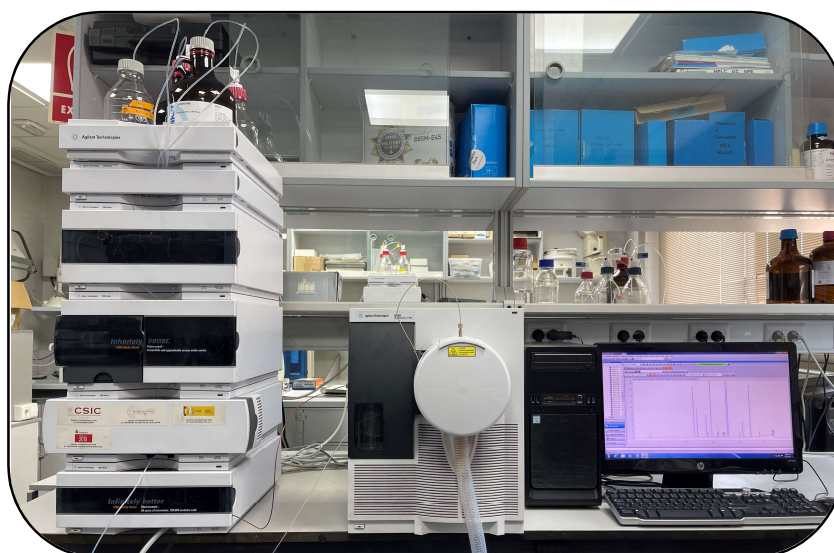


Figura 3.4. Oxidación de ADS a ADSO por la acción del PAA.

Para la separación cromatográfica y la posterior detección de los compuestos se utilizó un HPLC-DAD (Agilent 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) (**Fotografía 3.2**) La λ se estableció en 410 nm (ref. 600 nm) y el volumen de muestra que se inyectó fue de 10 μ L. Los compuestos se separaron en una columna C8 (Agilent Zorbax Eclipse XD8-C8, 4.6 x150 mm, 5 μ m de tamaño de partícula. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La T^a de la columna fue de 25 $^{\circ}$ C, y el flujo de 1 mL min^{-1} . Las fases móviles consistieron en agua (A) y acetonitrilo (ACN) (B), comenzando con un 20% de ACN y alcanzando el 85% en 8 min. Este gradiente se mantuvo durante 1 min para la vuelta a condiciones iniciales a los 10 min, con un tiempo total de análisis de 12 min. Para la cuantificación del PAA, se preparó una curva de calibración a partir de una solución stock de ADSO (0.544 mM), con 2 mg de ADSO en 10 mL (agua:ACN, 50:50, volumen/volumen).



Fotografía 3.2. HPLC-DAD 1290 Infinity (Agilent).

- **Kit de valoración volumétrica.** Esta metodología consiste en una valoración yodométrica simplificada utilizando un kit de valoración comercial (Drop titration

kit, AquaPhoenix Scientific, Hanover, PA, Estados Unidos) (**Fotografía 3.3**). Se trata de una valoración de oxidación-reducción donde se utilizó un volumen de muestra de 30 mL al que se le añadió 10 gotas de 50% de ácido sulfúrico, 1 gota de 50% de yoduro potásico (KI) y 5 gotas de 1% la solución indicadora de almidón. La concentración de PAA se determinó calculando el volumen de 0.1 N de tiosulfato de sodio consumido hasta alcanzar el punto final, donde la disolución cambia de un color azul oscuro a transparente. La concentración del desinfectante se calculó multiplicando el número de gotas de tiosulfato de sodio consumido en la valoración por 15 mg L^{-1} . Esta valoración puede presentar interferencias en rangos de pH superiores a 8.0.



Fotografía 3.3. Kit de valoración volumétrica (Drop titration kit, AquaPhoenix Scientific).

- **Método reflectométrico.** La concentración de PAA se determinó reflectométricamente, utilizando un reflectómetro comercial (RQflex® 10 reflectometer. Merck, Darmstadt, Alemania) (**Fotografía 3.4**), que incluye unas tiras reactivas con un sustrato cromogénico que se oxida por la acción del PAA, y éste es posteriormente determinado reflectométricamente logrando selectividad en

la determinación del PAA (Fischer y col., 1990). En concreto, el PAA reacciona con un compuesto derivado del fenol produciendo una coloración violeta que se determina reflectométricamente. Previamente, el reflectómetro se calibró con una tira con un código de barras. Para llevar a cabo la medida del PAA, se sumerge la tira durante 3 s en la muestra eliminado posteriormente el exceso de agua e introduciéndola en el adaptador del reflectómetro para leer la concentración de PAA en la pantalla tras 15 s. El rango de medida de esta metodología es de 75-400 mg L⁻¹ de PAA y el intervalo de pH de las muestras analizadas debe encontrarse entre 2.0-10.0.



Fotografía 3.4. Reflectómetro (RQflex® 10 reflectometer, Merck).

- **Sensor amperométrico.** La concentración de PAA fue determinada mediante amperometría, basada en una reacción electroquímica que registra cambios en la intensidad de la corriente eléctrica por las reacciones químicas que se producen en, función de la concentración del analito medido. Para ello, se utilizó un sensor de medición (Citroside® System, Productos Citrosol S.A), consistente en una membrana semipermeable a través de la que difunde el PAA, protegiendo a los electrodos que se encuentran inmersos en una solución electrolítica. La señal

eléctrica en el electrodo de medida es proporcional a la concentración de PAA en la muestra, la cual se registra en una pantalla que permite la monitorización de este desinfectante en continuo. Los valores de PAA se muestran en mg L^{-1} (**Fotografía 3.5**). Previo al comienzo de las mediciones, el sensor se calibró con agua sin PAA, así como con una concentración conocida de PAA.



Fotografía 3.5. Sensor amperométrico (Citroside® System, Productos Citrosol S.A).

- **Método cronoamperométrico.** La concentración de desinfectante se determinó utilizando un sensor cronoamperométrico (PAASense, Palintest, Gateshead, Reino Unido), basado en la reducción electroquímica del PAA y su posterior detección amperométrica, dependiendo de la relación corriente-tiempo. Para ello, se toma la muestra en una cubeta (50 mL), introduciendo ésta en el equipo de medida, así como una tira consistente en un sensor desechable de un solo uso. Una vez cerrado el equipo, el sensor queda sumergido en la muestra, aplicando un voltaje fijo y registrando la intensidad de la corriente resultante a lo largo del tiempo (1 min). La intensidad de la corriente registrada será proporcional a la concentración del desinfectante en la muestra, la cual aparecerá en la pantalla tras el tiempo de

medida. Específicamente, el sensor desechable utilizado tiene dos electrodos, calibrado cada uno para medir distintos valores de PAA, leyendo el equipo la señal de ambos y seleccionando el mejor resultado. El equipo no requiere calibración, únicamente se necesita introducir un código en el equipo, perteneciente al número de lote del sensor desechable utilizado. Durante la fabricación se le asigna un código de calibración a cada lote de sensores. Este código se utiliza para construir la curva de calibración para los sensores utilizados. El rango de medida de PAA con este equipo es de 2-2000 mg L⁻¹ (Palintest, 2022a). Asimismo, además de la utilización de este equipo para la comparación de metodologías para la determinación de PAA en agua de lavado, esta metodología también se aplicó para las determinaciones de PAA en las aguas procedentes de EDARs, aunque utilizando una versión actualizada del equipo (Kemio, Palintest, Gatehead, Reino Unido), con un rango de medición más amplio, 0.02-4000 mg L⁻¹ (**Fotografía 3.6**).



Fotografía 3.6. Sensor cronoamperométrico (Kemio, Palintest).

7.2. Métodos para el análisis del cloro

Para el estudio comparativo de diferentes sensores y métodos analíticos para la dosificación de cloro libre proveniente de la desinfección con NaOCl (**Capítulo IV**), se utilizaron seis metodologías que se describen a continuación. En todos los casos, la concentración de cloro libre se expresó en mg L^{-1} .

- **Método colorimétrico del DPD (N, N-dietil-p-fenilendiamina).** Consiste en uno de los métodos más comunes para la detección de cloro libre. Esta metodología corresponde al método 4500Cl-G normalizado para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, 2014). Se puede utilizar tanto para la detección y cuantificación de cloro libre, así como cloro combinado y total, aunque puede presentar algunas interferencias debido a la presencia de iones yoduro. Se basa en la oxidación del indicador DPD a una especie coloreada. Concretamente la amina DPD es oxidada por el cloro, produciendo dos productos de oxidación. En condiciones de pH neutro, el compuesto de oxidación principal es un compuesto catiónico semiquinoide, que se conoce como colorante Würster. Éste es relativamente estable y confiere un color magenta con máximos de absorbancia a λ de 512 y 553 nm, por lo que se puede determinar a espectrofotométricamente. Sin embargo, con niveles muy altos de oxidante, el DPD dará lugar a una imina incolora y relativamente inestable (**Figura 3.5**). Asimismo, si se deja unos segundos, la especie coloreada (Würster) formará rápidamente el producto final incoloro, por lo que se recomienda realizar la medida de absorbancia inmediatamente, después de adicionar el reactivo y la solución tampón. Asimismo, se puede determinar el cloro total con el método del DPD tras la adición de yoduro potásico (KI) a la muestra, el cual reaccionará con las cloraminas, que oxidarán el KI, transformándolo en yodo, que reaccionará a su vez con el DPD, tomando una segunda lectura de absorbancia (Hach, 2022).

Por último, la concentración de cloro combinado se determinará como la diferencia de concentración entre el cloro total y el cloro libre, medido mediante el DPD (Saputro y col., 2012).

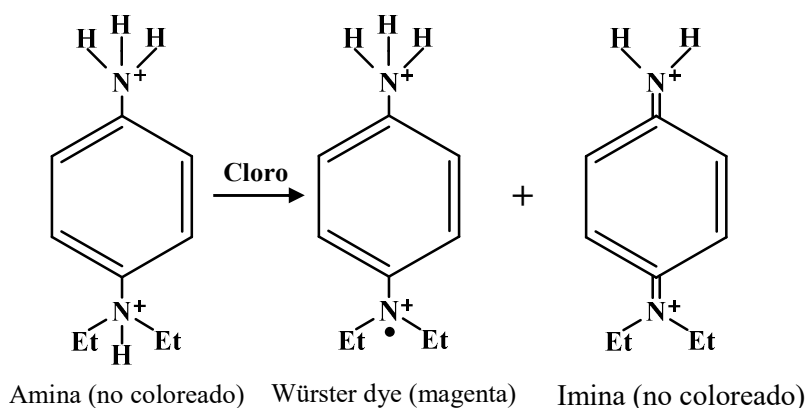


Figura 3.5. Productos de la reacción del cloro con el DPD (Saputro y col., 2012).

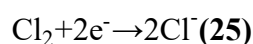
Concretamente, para la medición del cloro libre, se añadió 0.5 mL de tampón fosfato y 0.5 mL de solución indicadora de DPD en un tubo ensayo donde se añadió posteriormente la muestra de agua (10 mL). Esta mezcla se agitó y se midió su absorbancia inmediatamente a una λ de 515 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu UV-1603, Kioto, Japón). Asimismo, para la cuantificación de cloro libre, se preparó una recta de calibrado a diferentes concentraciones, desde 0 a 4 mg L⁻¹. Para cada uno de los puntos de la recta de calibrado, se midió su absorbancia después realizar el mismo procedimiento que para las muestras. En todas las mediciones de absorbancia se realizaron blancos de las muestras sin la adición de los reactivos correspondientes, para evitar interferencias debidas al color o turbidez de la muestra. El rango de medida de esta metodología fue de 0.01- 4 mg L⁻¹ de cloro libre.

- **Método espectrofotométrico del DPD.** Esta metodología consiste en el método colorimétrico DPD, método 4500Cl-G (APHA, 2014), pero utilizando una versión simplificada con un kit comercial de medida (Test de cloro Spectroquant, Supelco, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) (**Fotografía 3.7**). Igual que en la metodología anterior, el cloro libre oxida al DPD, dando lugar a un compuesto de color violeta rojizo, el cual se determinará espectrofotométricamente. Para la medida de cloro libre se utilizaron 10 mL de muestra, al que se añadió una microcuchara del primer reactivo incluido en el kit (Reactivo Cl₂-1). Esta mezcla se vorteoó, se dejó reposar durante 1 min y se trasvasó a una cubeta de medida para, inmediatamente, determinar la concentración de cloro con el espectrofotómetro (Spectroquant NOVA60, Merck, Darmstadt, Alemania), indicando directamente la concentración de cloro libre en la pantalla del equipo. El rango de medida de esta metodología es de 0.05 - 6 mg L⁻¹ de cloro libre, a un pH en el intervalo de 4.0-8.0. Asimismo, además de su utilización para la comparación de metodologías para la determinación de cloro libre en agua de lavado, esta metodología también se aplicó para las determinaciones de cloro libre y cloro total en la evaluación de los distintos reguladores de pH en la desinfección con NaOCl. Para la medición de cloro total se utilizaron 10 mL de muestra, al que se le añadió una microcuchara (Reactivo Cl₂-1), seguido de dos gotas del segundo reactivo del kit (Reactivo Cl₂-2). La mezcla se agitó, se dejó reposar 1 min y se determinó la concentración de cloro total espectrofotométricamente.



Fotografía 3.7. Método espectrofotométrico del DPD (Test cloro y Spectroquant NOVA60).

- **Método amperométrico de titulación.** Esta metodología corresponde al método 4500Cl-D normalizado para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, 2014). Consiste en una técnica electroquímica donde se aplica un potencial constante entre dos electrodos y el punto final de la valoración se determina mediante la variación en la intensidad de la corriente, como resultado de la reacción química que ocurre, dependiendo del valorante añadido. Para llevar a cabo esta titulación se utilizó un valorador automático (785 DMP Titrino, Metrohm, Herisau, Suiza), acoplado a un electrodo doble de platino, y un software de análisis (TIAMO, Metrohm, Herisau, Suiza) (**Fotografía 3.8**). Para la valoración amperométrica del cloro libre, se aplicó como agente reductor el óxido de fenilarsina (PAO, PhAsO) ajustado a pH 7.0, así como una diferencia de potencial entre los dos electrodos (ánodo y cátodo). Durante este proceso, el cloro libre se reduce a cloruro en el cátodo, mediante la reacción con el PAO y el arsénico del PAO se oxida en el ánodo, pasando de valencia +3 a valencia +5 (**Ecuaciones 25-28**).





La corriente fluye a través de la celda electroquímica hasta que todo el agente oxidante (cloro libre) haya reaccionado y la intensidad de la corriente sea cero, o cuando no se consigue un descenso en la lectura al añadir más PAO, punto que indica el final de la valoración. La concentración de cloro libre en la muestra es proporcional a la cantidad de PAO utilizado durante la valoración. El rango de medida de esta metodología es de 0.01-20 mg L⁻¹ a un pH entre 6.5 y 7.5 (Desiderio y Nibbering, 2010; Saputro y col, 2012; OmegaPeru, 2020).



Fotografía 3.8. Valorador amperométrico (785 DMP Titrino, Metrohm).

Para ello se seleccionó un volumen de muestra de manera que, atendiendo a la concentración estimada de la misma, no se consumiera en la valoración más de 2 mL de PAO (0.00564N). Seguidamente, se añadió 1 mL de tampón fosfato a pH 7.0 y se comenzó la valoración, teniendo la muestra en agitación continua, añadiendo 10 µL de PAO cada 5 segundos y midiendo los cambios en la intensidad

de la corriente en este intervalo de tiempo. La concentración de cloro libre se determinó según la **Ecuación 29**:

$$\text{Cloro libre (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{mL de PAO consumidos} \cdot 200}{\text{mL de muestra}} \quad (29)$$

- **Método reflectométrico.** La concentración de cloro libre se determinó reflectométricamente, utilizando un reflectómetro comercial (RQflex® 10 reflectometer, Merck, Darmstadt, Alemania) y un kit comercial que incluye unas tiras reactivas y un reactivo (Merck, Darmstadt, Alemania). Al igual que las metodologías explicadas anteriormente, éste también consiste en un método colorimétrico donde el cloro libre oxida al DPD, y es posteriormente determinado reflectométricamente. En primer lugar, el reflectómetro se debe calibrar con una tira con un código de barras. Seguidamente se tomó una muestra del agua de lavado (10 mL) y se añadieron cinco gotas del reactivo (Reactivo Cl₂-1). La mezcla se agitó ligeramente y la tira reactiva se sumergió en la mezcla durante 2 s, eliminando posteriormente el exceso de líquido, introduciéndola en el adaptador del equipo para leer la concentración de cloro libre en la pantalla, tras 15 s. El rango de medida de esta metodología es de 0.01-10.0 mg L⁻¹ de cloro libre y el intervalo de pH de las muestras analizadas debe encontrarse entre 5.0-10.0.

- **Sensor amperométrico.** Este sensor (Dulcotest CLR 1, ProMinent GmbH, Heidelberg, Alemania) (**Fotografía 3.9**) está formado por unos electrodos inmersos en una solución electrolítica y cubiertos por una membrana semipermeable, la cual permite la difusión del analito a determinar, evitando el contacto con otras sustancias presentes en el agua de lavado, aumentando la vida útil de los electrodos.

Permite la monitorización amperométrica en continuo de la concentración de desinfectante, en este caso cloro libre, el cual difunde a través de la membrana semipermeable proporcionando una señal proporcional a la concentración del mismo. Previo al comienzo de las mediciones, el sensor se calibró con agua sin cloro, así como con una concentración conocida de cloro libre. Esta metodología determina la concentración de cloro libre en un rango de 10 - 200 mg L⁻¹ y admite amplios rangos de pH, funcionando incluso a niveles de pH 8.0. (Prominent, 2022).



Fotografía 3.9. Sensor amperométrico para el cloro (Dulcotest CLR 1, ProMinent) (Prominent, 2022)

- **Método cronoamperométrico.** Este método se basa en el mismo principio que el descrito para el PAA, donde se aplica un voltaje fijo a través de un electrodo, registrando la intensidad de la corriente resultante a lo largo de un minuto, siendo esta intensidad directamente proporcional a la concentración de cloro. La metodología de funcionamiento es la misma que la descrita para la determinación del PAA, aunque utilizando un equipo específico para ello (ChloroSense HR, Palintest, Gateshead, Reino Unido). Sin embargo, en el caso del cloro, los sensores desechables utilizados tienen dos electrodos de trabajo, uno que mide cloro libre y otro que mide cloro total. De esta manera, el voltaje es seleccionado para que el

equipo pueda medir cloro libre y total de manera simultánea. El rango de medida para cloro libre es de 0.1-25 mg L⁻¹, y para cloro total es de 1-500 mg L⁻¹. Asimismo, además de su utilización para la comparación de metodologías para la determinación de cloro libre en agua de lavado, esta metodología también se aplicó para las determinaciones de cloro en la validación de la metodología para el análisis de HAAs en producto vegetal fresco y en agua de proceso, así como para las determinaciones de cloro en las aguas procedentes de las EDARs. Sin embargo, se utilizó una versión actualizada del equipo de medida (Kemio, Palintest, Gatehead, Reino Unido), con un rango de cuantificación más amplio, siendo para cloro libre de 0.02-100 mg L⁻¹, y para cloro total de 0.02-500 mg L⁻¹ (Palintest, 2022b).

8. MEDICIÓN DE LAS ESPECIES DE CLORO LIBRE (HOCl/ClO⁻)

Para determinar el rango de pH al cual el porcentaje de HOCl en agua clorada sea el máximo (**Capítulo VI**), se midieron los cambios en las proporciones de las diferentes especies activas del cloro (HOCl/ClO⁻) a lo largo de un amplio rango de pH (3.0-11.0), utilizando cuatro reguladores de pH: ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico. Para un pH <8,0, se añadieron soluciones 1 N de cada regulador para alcanzar el pH deseado, y para pH > 8,0, se añadió 5 M de NaOH. La caracterización de ambas especies se realizó mediante espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS), en soluciones con una alta concentración en cloro libre (100 mg L⁻¹). HOCl y ClO⁻ presentan máximos de absorbancia a unas λ de 292 y 254 nm, respectivamente. Una vez preparada las aguas cloradas en agua ultrapura, se ajustó el pH con los distintos reguladores y se midieron las absorbancias a las λ indicadas antes de 1 min, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-630, Tokio, Japón) y cubetas de cuarzo con longitud de camino óptico de 10

mm (Hellma, Müllheim, Alemania). Una vez realizadas las mediciones, se obtuvo la concentración de cada una de las especies del cloro a partir de las medidas de absorbancia por la Ley de Beer-Lambert, conociendo la absorptividad molar de cada una de ellas (**Ecuación 30**):

$$A = \epsilon bc \text{ (30)}$$

donde “A” es la medida de la absorbancia, “ ϵ ” el coeficiente de absorptividad molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), “b” la longitud de camino óptico (cm) y “c” la concentración (M). Los coeficientes de absorptividad molar a las λ dadas fueron de 100 y $350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para el HOCl y ClO^- , respectivamente. En este caso, la concentración de cloro libre se calculó como la suma de las concentraciones de las especies HOCl e ClO^- espectrofotométricamente calculadas, y la proporción de cada una de las especies se expresó como el % con respecto al total de cloro libre (Morris, 1966; Johnson y Melbourne, 1996; Len y col., 2000).

9. MEDICIÓN DE CLORO GAS (Cl_2)

Para estudiar la posible implicación de los reguladores de pH en la formación de cloro gas (Cl_2) (**Capítulo VI**), se estableció un protocolo para la medición del mismo. Para ello, se prepararon diferentes concentraciones de cloro libre en agua ultrapura (60, 80, 100 y 140 mg L^{-1}) y se reguló el pH a 3.5 y 5.0, comparando ácido cítrico y fosfórico. Se analizaron los niveles de cloro libre, combinado y total a tiempo 0 min y 15 min. Posteriormente, se determinó la posible formación de Cl_2 en las mismas condiciones indicadas, tras 15 min de preparación de la muestra. La posible presencia de Cl_2 se determinó por cromatografía de gases, mediante el protocolo descrito previamente (Hunt

y Alder, 1996), con algunas modificaciones. Tras la preparación de la muestra, se transfirió un volumen de muestra (17.5 mL) a un vial de vidrio manteniéndolo cerrado herméticamente durante 15 min a T^a ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra del espacio de cabeza (0.5 mL), y se analizó por cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica GC-TCD (Shimadzu CG-14B, Kyoto, Japón) (**Fotografía 3.10**). Debido a la falta de disponibilidad de un patrón de Cl₂, los resultados se expresaron según la relación área Cl₂/área O₂. Se analizaron tres réplicas por cada una de las soluciones cloradas.



Fotografía 3.10. GC-TCD (CG-14B, Shimadzu).

10. ANÁLISIS DE SUBPRODUCTOS DE DESINFECCIÓN (DBPs)

10.1. Trihalometanos (THMs)

El análisis de los cuatro THMs se realizó por GC-MS, según la metodología previamente descrita (Gómez-López y col., 2013). Para ello, se transfirieron 5 mL de agua a un vial de vidrio al que se añadió un estándar interno (1-bromo-3-cloropropano) a una concentración final de 20 µg L⁻¹. La muestra se equilibró durante 15 min a 35 °C. Los

THMs del espacio de cabeza se adsorbieron durante 15 min a 35 °C mediante una microextracción en fase sólida (SPME), con una fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm) (Supelco, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos). La determinación de THMs se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (GC-MSD), con una fuente de impacto electrónico (Agilent 5975C series inert MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) (**Fotografía 3.11**). La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar (HP-5MS 30 m × 0.25 mm. Agilent Technologies). La inyección de la muestra se realizó a 230 °C en modo “splitless”, excepto en aquellos casos donde la concentración de THMs fue superior a 200 µg L⁻¹, en los que se analizó aplicando un “split” de 1:100. Para la identificación de los THMs se comparó el espectro completo (Full Scan) de todos los iones con la librería “NIST Mass Spectral Library, 2008”. Posteriormente, la cuantificación se realizó seleccionando iones concretos para cada uno de los THMS (modo SIM, selected ion monitoring), Los resultados se expresaron en µg L⁻¹. Los LoQ se calcularon como la concentración más baja validada con una adecuada exactitud (veracidad y precisión), siendo de 0.05 µg L⁻¹ para triclorometano (TCM), 0.1 µg L⁻¹ para bromodiclorometano (BDCM) y clorodibromometano (CDBM), y 0.5 µg L⁻¹ para tribromometano (TBM).



Fotografía 3.11. GC-MSD 5975C series inert MSD (Agilent).

10.2. Ácidos haloacéticos (HAAs)

Para la determinación de los 9 HAAs se optimizó y validó una metodología para la detección y cuantificación de estos subproductos tanto en producto vegetal, tomando lechuga fresca cortada como modelo, como en su agua de lavado (**Capítulo V**). La metodología de análisis se validó siguiendo las recomendaciones de la guía SANTE de “Procedimientos para el control de la calidad analítica y la validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos” (SANTE, 2019). La metodología validada también se utilizó en las determinaciones de HAAs en el estudio de la influencia de los reguladores de pH en la formación de subproductos de desinfección (DBPs), así como en la determinación de HAAs en las aguas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), tras los tratamientos terciarios de desinfección.

10.2.1. Preparación de soluciones patrón y matrices para la validación

Las disoluciones de los patrones correspondientes de HAAs se prepararon diluyendo la solución madre o stock en metil tert-butil éter y almacenándolas a 4 °C. De forma separada se siguió el mismo procedimiento para los patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) de los HAAs. Cada día de análisis se prepararon soluciones frescas en agua ultrapura a partir de las indicadas.

Preparación de la matriz de lechuga

Se utilizó lechuga iceberg (*Lactuca sativa L.*) comprada localmente (Murcia), la cual no contenía HAAs. La lechuga se cortó manualmente en fragmentos de 6 mm (L6) utilizando un cuchillo afilado de acero inoxidable. Posteriormente, unos 100 g aproximadamente se congelaron con nitrógeno líquido y se trituraron (Blixer 2 Robot Coupe). Se pesaron muestras de 10.0 ± 0.1 g en tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL. Seguidamente, se añadió 10 mL de agua ultrapura acidificada (1% de ácido fórmico) y 0.5 mL de agua ultrapura. Esta solución se vorteoó durante 2 min y se centrifugó (4696 xg durante 15 min a 4 °C). Posteriormente, el sobrenadante se filtró con filtros de 0.22 μm de tamaño de poro (Minisart, PES, Sartorius, Gottingen, Alemania). Durante todo el proceso de extracción, las muestras se mantuvieron en frío. Los resultados para la cuantificación de los HAAs se expresaron en $\mu\text{g kg}^{-1}$ (**Figura 3.6**).

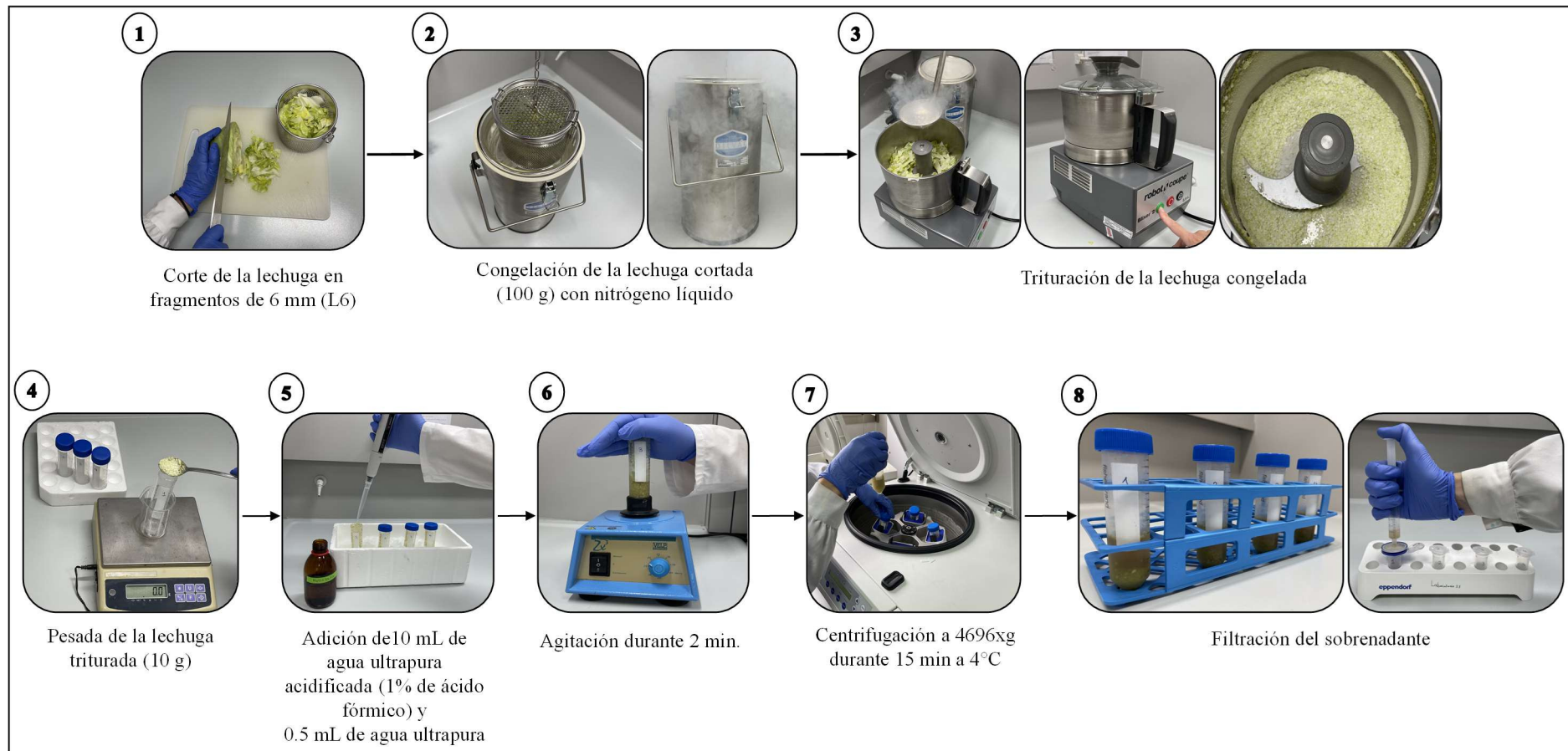


Figura 3.6. Procedimiento de extracción para la lechuga cortada.

Preparación de la matriz de agua de lavado

La matriz de agua de lavado utilizada en la validación se preparó sumergiendo 500 g de lechuga cortada en 1 L de agua del grifo y agitando la mezcla en frío (5 °C) durante 15 min, aproximadamente. El pH se ajustó a 5.5 con 1 M de ácido fosfórico. Seguidamente, la mezcla se filtró con una malla de poliamida (0.25 mm de tamaño de poro), se diluyó con agua del grifo hasta alcanzar dos niveles de DQO (400 y 800 mg L⁻¹) y se añadió 3 M de tiosulfato de sodio. Finalmente, el agua se filtró a través de filtros de tamaño de poro de 0.22 µm (Minisart, PES, Sartorius, Gottingen, Alemania). Los resultados para la cuantificación de los HAAs se expresaron en µg L⁻¹.

10.2.2. Análisis por UHPLC-MRM

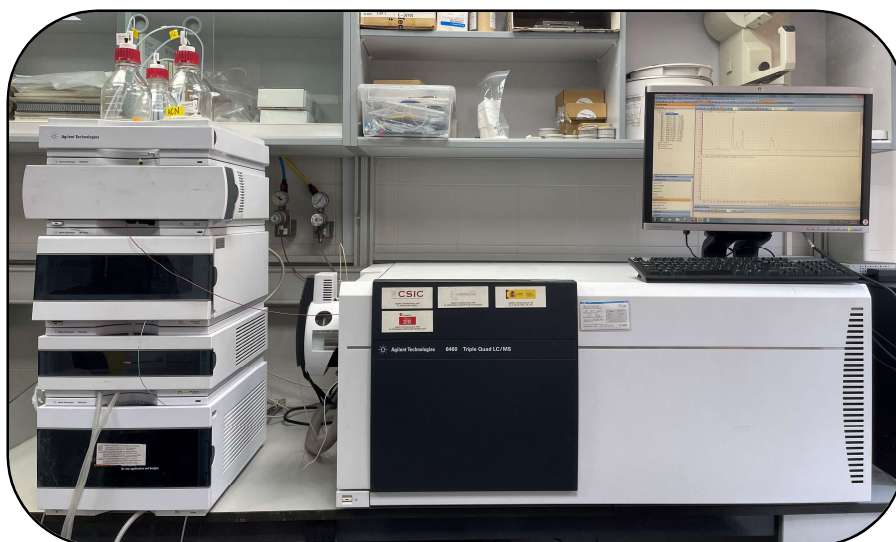
La separación cromatográfica de los compuestos y la posterior detección por espectrometría de masas se llevó a cabo según la metodología descrita por do Lago y Daniel (2019), con algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (1290 infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (Agilent 6460), con ionización por electrospray en modo negativo (UHPLC-ESI-QqQ) (**Fotografía 3.12**). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 (InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 x 150 mm, 2.7 µm, Agilent Technologies), con un flujo de 0.3 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 15 µL. Asimismo, se siguieron los criterios de la guía SANTE (SANTE, 2019), según los cuales:

- Para cada uno de los HAAs analizados, se optimizaron dos transiciones para la adquisición de datos mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La transición más intensa para cada uno de los HAAs se seleccionó como “transición

cuantificadora”, y la segunda más intensa como “transición cualificadora”. La optimización de las transiciones se llevó a cabo mediante la “infusión directa” de una mezcla de patrones de los 9 HAAs, a una concentración de $500\mu\text{g L}^{-1}$.

- Se comprobó que el tiempo de retención de los HAAs en la curva de calibración en comparación con el tiempo de retención de los HAAs en las muestras no presentaba una diferencia mayor a ± 0.1 min.
- Para cada uno de los HAAs estudiados, la diferencia del valor promedio de la “relación de iones” (área del pico de la transición cualificadora/área del pico de la transición cuantificadora) entre la curva de calibración en solvente (agua ultrapura) y las curvas de calibración en las matrices estudiadas (agua de lavado y tejido vegetal) no debía ser mayor del 30%. Para la evaluación de la “relación de iones”, se prepararon curvas de calibración fortificadas en agua ultrapura y en matrices blancas (sin presencia de HAAs), de agua de lavado y lechuga fresca cortada.

Todos los HAAs se cuantificaron utilizando curvas de calibración con patrón interno, utilizando patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) para cada uno de los compuestos. Se cuantificaron los HAA5 (ácido monocloroacético (MCAA), ácido monobromoacético (MBAA), ácido dicloroacético (DCAA), ácido dibromoacético (DBAA) y ácido tricloroacético (TCAA)) según sus correspondiente ILIS. Asimismo, ácido tribromoacético (TBAA), ácido clorodibromoacético (CDBAA) y ácido bromodicloroacético (BDCAA) se cuantificaron utilizando el patrón interno de ácido tricloroacético ($\text{TCAA-}^{13}\text{C}$) y ácido bromocloroacético (BCAA) se cuantificó con el patrón interno de ácido dicloroacético ($\text{DCAA-}^{13}\text{C}$).



Fotografía 3.12. UHPLC-ESI-QqQ 1290 infinity, 6460 (Agilent).

10.2.3. Validación de la metodología

La metodología analítica se validó para lechuga cortada y su agua de lavado, atendiendo a criterios de selectividad, especificidad, evaluación de la curva de calibración y linealidad, límites de cuantificación (LoQ) y detección (LoD), evaluación del efecto matriz y exactitud, estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado y medición de la incertidumbre. Finalmente, la verificación de la metodología validada para el análisis de los 9 HAAs se realizó en muestras procedentes de una empresa de IV gama. Asimismo, atendiendo al parámetro de validación, las matrices blancas preparadas se fortificaron con una mezcla de patrones de los 9 HAAs a concentraciones finales de 5, 20 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ en agua de lavado y 5, 20 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en lechuga, así como una mezcla de ILIS a una concentración final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para agua de lavado y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para lechuga. Según el parámetro estudiado, las matrices blancas se fortificaron antes o tras el proceso de extracción descrito anteriormente.

10.2.3.1. Selectividad y especificidad

La selectividad de la metodología se evaluó según la capacidad para discriminar entre los HAAs estudiados y otros posibles analitos presentes en la muestra. La especificidad se determinó como la habilidad del espectrómetro de masas en proporcionar señales que efectivamente identificaran los 9 HAAs (Raposo y Ibelli-Bianco, 2020). Para ello se evaluó la respuesta de los HAAs fortificados tanto en agua ultrapura (solvente), como en las matrices blancas de lechuga y agua de lavado.

10.2.3.2. Curvas de calibración y linealidad

Para la evaluación de la función respuesta y de la bondad de ajuste de la curva de regresión se utilizaron curvas de calibración ($\text{LoQ}-1000 \mu\text{g L}^{-1}$) con trece niveles de calibración y tres réplicas por nivel para cada uno de los HAAs. Las curvas de calibración se prepararon en agua ultrapura y en las dos matrices estudiadas. Los HAAs se cuantificaron utilizando curvas de calibración con ILIS, donde se utilizó la relación (área del pico patrón HAA/área del pico ILIS) frente a la concentración de cada HAA. Asimismo, la curva de regresión se evaluó considerando la independencia de las observaciones, la evaluación de la normalidad de la distribución de datos, la evaluación de la homogeneidad de las varianzas y la evaluación de la linealidad. Posteriormente, la linealidad se evaluó comparando, para cada punto de calibración, el valor de concentración obtenido experimentalmente (X_{exp}) con el valor teórico (X_{theo}) y expresado como porcentaje de error relativo (%ER) (**Ecuación 31**) (Montgomery y col., 2006):

$$\%ER = [(X_{\text{exp}} - X_{\text{theo}}) / X_{\text{theo}}] \cdot 100 \quad (31)$$

Asimismo, se evaluó el promedio del porcentaje de error relativo de toda la curva de calibración (%ER_{AVER}), así como el máximo porcentaje de error relativo (%ER_{MAX}) (Raposo, 2016).

10.2.3.3. Límite de cuantificación (LoQ) y límite de detección (LoD)

Para cada HAA, los LoQ y LoD se calcularon utilizando la desviación estándar del intercepto (sb) y la pendiente (m) de la curva de regresión (**Ecuación 32**) (Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos [FDA], 1996):

$$\text{LoD} = (3.3 \cdot \text{sb})/m \quad \text{LoQ} = (10 \cdot \text{sb})/m \quad (32)$$

Atendiendo a los criterios de la guía SANTE, los límites anteriormente calculados también se verificaron como la concentración más baja validada con una exactitud (veracidad y precisión) adecuada (SANTE, 2019). Para ello se analizaron cinco réplicas de las matrices blancas, tanto de lechuga como de agua de lavado, fortificadas con diferentes concentraciones de HAAs alrededor de los valores previamente estimados, determinando el porcentaje de recuperación absoluta o veracidad y la precisión. Para el cálculo de las concentraciones se realizaron curvas de calibración en agua ultrapura y en matriz, por lo que los LoQ y LoD se validaron con ambos tipos de calibración. Asimismo, también se calcularon los LoQ y LoD instrumentales, analizando diferentes concentraciones de HAAs en agua ultrapura y calculando el porcentaje de recuperación absoluta y la precisión, tal y como se ha indicado anteriormente.

10.2.3.4. Evaluación del efecto matriz

El efecto matriz se evaluó en agua de lavado con dos niveles de DQO (400 y 800 mg L⁻¹) y en lechuga. Para ello se comparó la respuesta de los HAAs en agua ultrapura (solvente) con la respuesta de los HAAs fortificados en las matrices indicadas (SANTE, 2019). Cada una de las matrices se fortificaron con las tres concentraciones indicadas anteriormente, calculando el porcentaje de efecto matriz (ME %) (**Ecuación 33**). Se analizaron tres réplicas por cada nivel de concentración:

$$ME (\%) = \frac{\text{Relación (área del pico de HAA/área del pico de ILIS) en muestras fortificadas tras la extracción}}{\text{Relación (área del pico de HAA/área del pico de ILIS) en solvente}} \cdot 100 \quad (33)$$

El efecto matriz también se calculó a lo largo de todo el rango de concentraciones incluidas en la curva de calibración, comparando las pendientes de las curvas de calibración en las matrices y en el solvente (Lehotay y col., 2010) Para ello, cada curva de calibración fue preparada por triplicado para cada HAA, en cada una de las matrices indicadas, así como en solvente (**Ecuación 34**):

$$ME (\%) = \frac{\text{Pendiente de la curva de calibración en matriz}}{\text{Pendiente de la curva de calibración en solvente}} \cdot 100 \quad (34)$$

Por último, para determinar el efecto matriz se realizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias estadísticas entre las pendientes de las curvas de calibración en matriz y solvente (Raposo y Barceló, 2021).

10.2.3.5. Veracidad

La veracidad de la metodología se evaluó mediante la evaluación del porcentaje de recuperación, comparando la concentración experimental con la teórica o de referencia. Para ello, se evaluaron dos tipos de recuperaciones: la recuperación relativa y la recuperación absoluta, utilizando curvas de calibración en matriz (Raposo y Ibello-Bianco, 2020).

- La **recuperación absoluta** evalúa el rendimiento de la etapa de extracción del procedimiento analítico. Para ello, las matrices blancas de agua de lavado y lechuga se fortificaron antes del proceso de extracción, tal y como se ha descrito anteriormente. Se analizaron cinco réplicas por concentración. Posteriormente, se calculó el porcentaje de recuperación absoluta (**Ecuación 35**):

$$\text{Recuperación absoluta (\%)} = \frac{\text{Concentración experimental de HAAs fortificado antes de la extracción}}{\text{Concentración teórica de HAAs en la muestra}} \cdot 100 \quad (35)$$

- La **recuperación relativa** evalúa la relación entre el valor experimental obtenido a través del procedimiento analítico que incluye la curva de calibración en comparación con el valor teórico de referencia. En este sentido, debido a que no se aplicó ningún procedimiento de extracción a las muestras de agua de lavado, la recuperación absoluta y relativa coincidiría. Sin embargo, las muestras de lechuga sí se sometieron a un procedimiento de extracción. Para la determinación de la recuperación relativa, la matriz de lechuga se fortificó con tres niveles de concentración, analizando cinco réplicas por cada nivel. Posteriormente, se calculó el porcentaje de recuperación relativa (**Ecuación 36**):

$$\text{Recuperación relativa (\%)} = \frac{\text{Concentración experimental de HAAs fortificado tras la extracción}}{\text{Concentración teórica de HAAs en la muestra}} \cdot 100 \quad (36)$$

10.2.3.6. Precisión

La precisión se evaluó como repetibilidad (RSD_r) y como precisión intermedia (RSD_{wr}) (SANTE, 2019). Ambas se determinaron fortificando las matrices blancas de agua de lavado y lechuga en los tres niveles de concentración explicados anteriormente:

- La **repetibilidad (RSD_r)** se evaluó fortificando ambas matrices, utilizando cinco réplicas por nivel de fortificación y llevando a cabo los análisis para la determinación de los HAAs por un único analista en un mismo día. La repetibilidad se calculó como la desviación estándar relativa (RSD) de la relación de las áreas de los picos evaluados (área del pico HAA/área del pico ILIS).
- Para la **precisión intermedia (RSD_{wr})**, cada día de análisis se prepararon cinco réplicas por nivel de fortificación, durante tres días consecutivos e interviniendo dos analistas. Se calculó la precisión intermedia como la RSD de la relación de las áreas de los picos evaluados durante los tres días de análisis (área del pico HAA/área del pico ILIS).

10.2.3.7. Estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado

La estabilidad de los HAAs se evaluó fortificando las matrices blancas de agua de lavado y lechuga tal y como se ha descrito anteriormente, preparando para ello cinco réplicas por nivel de fortificación. Las muestras fortificadas se almacenaron a 4 °C durante tres días, así como a -20 °C durante 21 días. Para el almacenamiento a 4 °C, la

estabilidad de las muestras se evaluó los días 1, 2 y 3, analizando las diferencias en la concentración de HAAs. Para la estabilidad a -20 °C, las muestras se descongelaron y la concentración de HAAs se analizó los días 1, 7 y 21. La estabilidad de los HAAs en las matrices estudiadas se calculó como la RSD de la concentración de HAAs calculada a lo largo de todo el período.

10.2.3.8. Incertidumbre

La medición de la incertidumbre (MU) se realizó mediante una aproximación simplificada utilizando los datos obtenidos durante el procedimiento de validación. Para ello, se fortificaron las dos matrices estudiadas teniendo en cuenta que, en el caso de la lechuga la fortificación se realizó antes del procedimiento de extracción. Se analizaron cinco réplicas por nivel de fortificación en tres días diferentes, obteniendo quince réplicas por nivel de fortificación. Para la medición de la incertidumbre se utilizó el componente de la incertidumbre para el sesgo (u' sesgo) y el componente de la incertidumbre para la precisión (u' precisión) (**Ecuación 37**).

$$MU = \sqrt{u'(\text{sesgo})^2 + u'(\text{precisión})^2} \quad (37)$$

Seguidamente, se calculó la incertidumbre expandida utilizando el factor de cobertura $k=2$ (**Ecuación 38**) (SANTE, 2019):

$$MU \text{ expandida} = k \cdot MU \quad (38)$$

10.2.3.9. Verificación de la metodología en muestras comerciales

La metodología validada previamente se verificó para el análisis de los 9 HAAs en muestras comerciales de lechuga iceberg cortada y en agua de lavado provenientes de una planta de procesado en IV gama. El proceso de lavado consistía en dos tanques consecutivos, uno de prelavado y otro de lavado, con 3000 L de agua clorada con NaOCl a 4 °C. Se realizaron mediciones, en ambos tanques, de cloro libre y cloro total, pH, CE y DQO. Se tomaron cinco muestras del tanque de prelavado (WT1) y cinco muestras del tanque de lavado (WT2). Las muestras se filtraron con una malla de poliamida de 0.25 mm de tamaño de poro y se alicuotaron en botellas estériles de polietileno de alta densidad. Se añadió 3 M de tiosulfato de sodio, como agente neutralizante del NaOCl. En la planta procesadora, después de pasar por los procesos de prelavado y lavado, la lechuga fresca cortada se enjuagó, se eliminó el agua por centrifugación y se envasó. Se tomaron cinco muestras independientes para el análisis de los HAAs. Las muestras de agua de lavado y de producto fresco cortado se transportaron en frío al laboratorio y se almacenaron a 4 °C. Los HAAs se analizaron dentro de las primeras 24 h, tras el muestreo. En cuanto a la determinación de los HAAs, se cuantificaron todos ellos con curvas de calibración en solvente, excepto en aquellos en los que se demostró que la matriz interfería en su análisis y cuantificación. Debido a ello, para la cuantificación del ácido bromocloroacético (BCAA) en agua de lavado se utilizó una curva de calibración en matriz con adición estándar, ya que no se disponía de matriz de agua de lavado sin la presencia de HAAs. Asimismo, la cuantificación de ácido tribromoacético (TBAA), ácido bromocloroacético (BCAA) y ácido clorodibromoacético (CDBAA) en lechuga se realizó utilizando curvas de calibración en matriz, utilizando lechuga sin lavar, y por tanto libre de HAAs, del mismo lote que las muestras de lechuga envasada recogidas.

10.3. Clorato

El clorato se analizó utilizando el método de referencia de la UE descrito para el análisis de pesticidas polares en alimentos vegetales (QuPPE) (Anastassiades y col., 2021), con ligeras modificaciones para muestras acuosas (Garrido y col., 2020). Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0.22 μm (Fisherbrand non-sterile PTFE syringe filter, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y posteriormente analizadas utilizando el equipo UHPLC-QqQ descrito anteriormente. Atendiendo al contenido inicial de clorato, algunas muestras fueron diluidas (metanol con ácido fórmico al 1%). Asimismo, se les adicionó un ILIS ($\text{Cl}_{18}\text{O}_3^-$) a una concentración final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto en las muestras como en los patrones utilizados para la curva de calibración. Los resultados se expresaron en mg L^{-1} , y el LoQ se estableció en 0.003 mg L^{-1} .

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó IBM SPSS Statistics para Windows, versión 27.0 (Armonk, Nueva York: IBM Corp). Para realizar el análisis de regresión se utilizó IBM Microsoft Excel 2016 (v16.0), utilizando una regresión lineal simple (**Capítulos IV, VI, VII y VIII**), una regresión cuadrática (**Capítulo VI**), o una regresión lineal ponderada (**Capítulo V**). Los resultados se representaron utilizando Sigma Plot 14.5 Systat Software, Inc. (Addilink Software Scientific S.L., Barcelona, España). Asimismo, a lo largo de los diferentes trabajos se analizó la distribución normal de los datos, mediante el test de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$), así como la homogeneidad de las varianzas utilizando el test de Levene ($p < 0.05$). En el **Capítulo V** se utilizó el test de Durbin-Watson, para evaluar la independencia de los residuos en la curva de regresión.

En algunos casos donde los datos mostraron una distribución paramétrica, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y, cuando se observaron diferencias significativas se realizó la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$) (**Capítulo VI**). Asimismo, previo a la realización de este test, en el **Capítulo IV**, y para la comparación de los sensores y metodologías para la determinación de cloro libre, se agruparon todos los datos atendiendo a la metodología de medición utilizada para cada desinfectante, a lo largo de los diferentes ensayos realizados. Igualmente, en el **Capítulo VI** se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson ($p < 0.05$) para comprobar la relación entre la cantidad de desinfectante añadido y la formación de clorato en el tanque de lavado. Por otra parte, se utilizó la prueba t de Student para la comparación de medias ($p < 0.05$). Concretamente, en el **Capítulo IV**, se utilizó para comparar cada metodología de medida del desinfectante PAA con la metodología de referencia, para cada uno de los niveles de materia orgánica (DQO o COT). En el **Capítulo V**, se utilizó para la evaluación del efecto matriz, determinando las diferencias entre las pendientes de las curvas de calibración en matriz y solvente. En el **Capítulo VIII** se utilizó para la comparación de las aguas provenientes de la extracción de proteína vegetal en los parámetros de caracterización evaluados. En este caso, los datos se compararon según la matriz utilizada (harina de haba y guisante), tipo de proceso de extracción (extracción alcalina y ácida) y etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas). Asimismo, para el análisis estadístico de algunos de los parámetros físico-químicos estudiados, se agruparon las muestras filtradas y sin filtrar, ya que las diferencias entre éstas no fueron cuantitativa ni estadísticamente significativas.

Después del análisis de la distribución de los datos, en el **Capítulo VII**, se aplicaron test no paramétricos. En concreto, una vez agrupados los resultados de los distintos DBPs obtenidos (THMs, HAAs y clorato) para cada una de las tecnologías de

desinfección utilizadas, se aplicó el test de Kruskal-Wallis para la comparación de estas tecnologías ($p < 0.05$). Seguidamente, en aquellos casos donde se mostraron diferencias significativas, se aplicó un test de Mann Withney ($p < 0.05$), para comparar cada tecnología de desinfección con la que utilizaba cloro.

CAPÍTULO IV

Estudio comparativo de diferentes sensores comerciales y métodos analíticos de medida para la dosificación de los desinfectantes ácido peracético y cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl) empleados en la etapa de lavado

Albolafio, S., Tudela, J.A., Hernández, N., Ortuño, J.A., Allende, A., Gil, M.I. (2021). Practical applications of sensor-based methodologies for monitoring peracetic acid (PAA) as a disinfectant of fresh produce wash water. *Food Control*, 121, 107632. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107632>.

Albolafio, S., Tudela, J.A., Hernández, N., Sosa, B.P., Allende, A. Gil, M.I. (2021). Monitoring and control of wash water sanitation. *Acta Horticulturae*, 1319, 75-80. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.131>.

1. OBJETIVO

En este estudio se realizó una comparación de diferentes sensores y métodos analíticos de medida de distintos desinfectantes, tales como el ácido peracético (PAA) y el cloro libre de la desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl), para la dosificación efectiva de ambos desinfectantes en la etapa de lavado. Para el estudio del PAA se generaron distintos tipos de agua de lavado de productos frescos enteros (manzanas 'Royal Gala', tomates 'Daniela', pimientos rojos 'California' y limones 'Verna') y para el estudio del cloro se generó agua de lavado de distintos productos frescos cortados (lechuga iceberg, col lombarda, y repollo), así como agua limpia sin materia orgánica (sin demanda de cloro). La desinfección de las aguas de lavado se realizó en un sistema dinámico que simuló un tanque de lavado de una línea comercial. Se realizaron distintos ensayos para cada una de las aguas generadas y los desinfectantes estudiados (PAA y cloro). En el estudio del PAA, se tomaron muestras del tanque de lavado a diferentes intervalos de tiempo, para la comparación de las metodologías de cuantificación de la concentración residual de PAA y para la determinación de la materia orgánica presente en el agua de lavado, utilizando el análisis del carbono orgánico total (COT), excepto en el agua de lavado de pimiento, donde se utilizó la demanda química de oxígeno (DQO), debido a las interferencias entre el agua de lavado del pimiento y las determinaciones de COT. Asimismo, durante cada uno de los ensayos se realizó la monitorización de los parámetros físico-químicos tales como pH, potencial de oxidación-reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE) y temperatura. Para este estudio se compararon cuatro metodologías. El análisis del PAA por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) fue previamente adaptado para agua de proceso y utilizado como método de referencia para la comparación con el resto de metodologías estudiadas (kit de valoración, método reflectométrico, sensor

amperométrico y sensor cronoamperométrico). En el estudio del cloro libre, se tomaron muestras del tanque de lavado a diferentes intervalos de tiempo, para la comparación de las metodologías de cuantificación de la concentración residual de cloro y para la determinación de la materia orgánica mediante la demanda química de oxígeno (DQO), así como la monitorización de otros parámetros físico-químicos, tales como pH, ORP y temperatura. Para la medida del cloro libre, se compararon seis sensores comerciales y métodos analíticos como el método colorimétrico del DPD (N,N-dietil-p-fenilendiamina), el método espectrofotométrico del DPD, método amperométrico de titulación, método reflectométrico, sensor amperométrico y sensor cronoamperométrico. También se realizó la comparación de estas metodologías en agua sin demanda de cloro. Asimismo, además de los parámetros para el control de la desinfección que se monitorizaron en cada uno de los ensayos descritos, también se realizó un profundo estudio acerca del potencial de oxidación-reducción (ORP) y su relación con la concentración de cloro libre presente en el agua de lavado, con la finalidad de determinar si el valor de ORP pudo ser un parámetro válido para el control y la monitorización efectiva de cloro en el agua de lavado. Para ello, se utilizaron valores de estos dos parámetros (cloro libre y ORP) monitorizados en sistema dinámico y realizados en diferentes ensayos, utilizando NaOCl como fuente de cloro, con concentraciones en un rango desde 0 hasta 40 mg L⁻¹ de cloro libre, aproximadamente, en agua de lavado de distintos productos (lechuga iceberg, cebolla y col cortadas, así como brotes tiernos), a pH constante entre 5.0-6.0.

La metodología llevada a cabo para este estudio está incluida en las secciones 2 (Generación del agua de lavado), 3 (Desinfección del agua de lavado), 6.1 (Análisis físico-químico y microbiológico), 7.1 (Métodos para el análisis del PAA) y 7.2 (Métodos para el análisis del cloro).

2. RESULTADOS

2.1. Comparación de metodologías para la monitorización del PAA

2.1.1. Características físico-químicas del agua de lavado

En cuanto a los parámetros físico-químicos monitorizados durante los cuatro ensayos realizados, el valor de pH, aunque mostrando ligeras variaciones atendiendo al ensayo realizado, se situó en un rango relativamente constante (pH 3.9-4.9) (**Tabla 4.1**). En cuanto al ORP, los valores de este parámetro fueron relativamente bajos, aunque constantes para todos los ensayos (ORP 409-461 mV) (**Tabla 4.1**). Asimismo, el agua de lavado de tomate y pimiento mostraron valores de CE superiores (753 y 802 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente), en comparación con el agua de manzana y limón (524 y 463 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente), evidenciando que el agua de tomate y pimiento presentaron una mayor concentración sólidos disueltos totales (**Tabla 4.1**). Asimismo, en cuanto a la determinación de la materia orgánica, ésta se realizó mediante la medición del carbono orgánico total (COT) para todas las aguas, excepto para el agua de lavado de pimiento, donde las medidas de COT variaron independientemente de la materia orgánica del agua, evidenciando las interferencias de esta medida en el agua de lavado de pimiento, por lo que la determinación de la materia orgánica se realizó mediante la demanda química de oxígeno (DQO) (**Tabla 4.1**). Además, tal y como se puede observar, el primer punto de muestreo presentó una alta concentración en materia orgánica para todos los ensayos, debido a la cantidad inicial de PAA (200 mg L^{-1} , aproximadamente) presente en el tanque de lavado, antes de la entrada de materia orgánica en el mismo (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1. Características físico-químicas incluyendo pH, potencial de oxidación-reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE), carbono orgánico total (COT) en agua de manzana, tomate y limón y demanda química de oxígeno (DQO) en agua de pimiento.

Agua de lavado	pH	ORP (mV)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	COT/DQO(mg L^{-1})
Manzana	4.33 \pm 0.35c	437.7 \pm 11.2b	523.9 \pm 18.2b	245-2000
Tomate	4.58 \pm 0.20b	426.2 \pm 8.2c	752.7 \pm 138.3a	215-1100
Pimiento	3.87 \pm 0.35d	460.7 \pm 12.9a	801.6 \pm 224.4a	490-13500
Limón	4.91 \pm 0.10a	408.9 \pm 6.8d	463.2 \pm 26.9b	200-550

Los valores de pH, ORP y CE corresponden al promedio \pm desviación estándar de veintisiete réplicas. Los valores de materia orgánica corresponden a un rango entre la menor y mayor concentración de COT o DQO, para cada uno de los 4 ensayos. Para cada parámetro, las diferentes letras en la misma columna muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$).

2.1.2. Análisis de PAA por HPLC-DAD en agua de proceso

Esta metodología se basa en el análisis del PAA de forma indirecta, mediante la oxidación del grupo sulfuro de la sustancia colorimétrica ADS al correspondiente sulfóxido (ADSO), por la acción del PAA, y la posterior detección y cuantificación del ADSO mediante HPLC-DAD, siendo la concentración del ADSO equivalente a la del PAA. En la **Figura 4.1** se muestra un cromatograma representativo para agua de lavado de manzana con PAA, donde se observa la perfecta separación e identificación, mediante su espectro UV-VIS, del ADSO oxidado por el PAA y del ADS en exceso que ha quedado sin reaccionar. Estos dos compuestos fueron detectados y cuantificados mediante el espectro de absorción UV a una longitud de onda de 410 nm, no mostrando interferencias con la matriz de agua de lavado de manzana. Asimismo, esta metodología tampoco

presentó interferencias con el agua de lavado de los otros productos estudiados como el tomate, el pimiento y el limón. Sin embargo, el límite máximo de PAA calculado con esta metodología utilizando una regresión lineal simple fue de 0.185 mM (14 mg L⁻¹) por lo que para la determinación del PAA en las aguas de proceso estudiadas se utilizó un factor de dilución, ya que su concentración se situó alrededor de 200 mg L⁻¹. Asimismo, los resultados mostraron que este método fue selectivo para la determinación del PAA en agua de proceso, por lo que se utilizó como método de referencia para la comparación del resto de metodologías estudiadas (kit de valoración, método reflectométrico, sensor amperométrico y sensor cronoamperométrico).

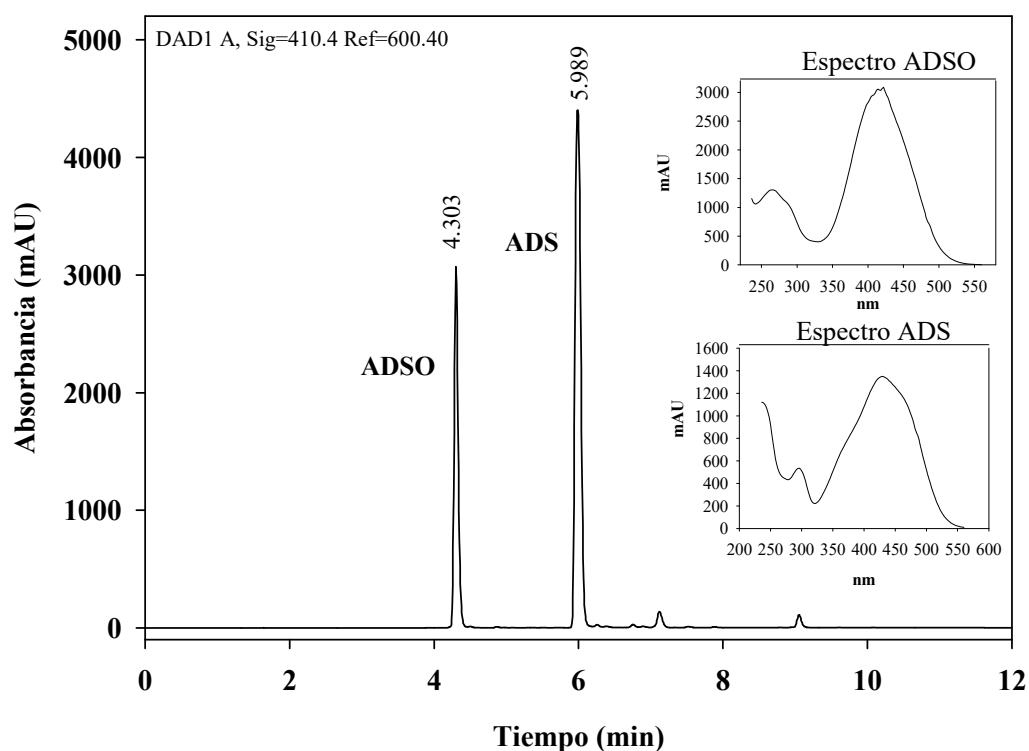


Figura 4.1. Cromatograma que muestra la separación y detección de ADS y ADSO a una longitud de onda ($\lambda=410$ nm), así como su identificación mediante los espectros UV-VIS, en agua de lavado de manzana con 50 mg L⁻¹ de ácido peracético (PAA) y 500 mg L⁻¹ de carbono orgánico total (COT).

2.1.3. Monitorización del PAA en agua de lavado de manzana

La comparación de las cuatro metodologías estudiadas con el análisis por HPLC-DAD para la determinación del PAA en agua de lavado de manzana mostró que conforme la materia orgánica aumentaba en el tanque de lavado, la concentración de PAA estaba sobreestimada tanto con el kit de valoración como con el método reflectométrico en un 10% y 12%, respectivamente (**Figura 4.2**). En cuanto al kit de valoración, estas diferencias se observaron para casi todos los niveles de COT. Algunos de los resultados obtenidos con esta metodología presentaron una alta desviación estándar, o incluso algunos puntos mostraron valores atípicos (COT de 1700 y 2000 mg L⁻¹), debido posiblemente a errores experimentales en la utilización del kit de valoración. En cuanto al método reflectométrico, los resultados mostraron también la sobreestimación de la concentración de PAA, pero en este caso a partir de un determinado nivel de materia orgánica en el tanque de lavado (COT de 1200 mg L⁻¹), aumentando la sobreestimación al aumentar la materia orgánica. En cuanto al sensor amperométrico, aunque las determinaciones de PAA realizadas con esta metodología mostraron diferencias significativas a niveles bajos de COT, no ocurrió lo mismo al aumentar la COT (**Figura 4.2**). Por el contrario, las determinaciones de PAA realizadas con el sensor cronoamperométrico no mostraron diferencias con las obtenidas mediante HPLC-DAD, para todas las concentraciones de COT. Estos resultados pusieron en evidencia que el sensor cronoamperométrico fue el método más adecuado para la determinación del PAA en agua de lavado de manzana. Los resultados se confirmaron en un segundo ensayo, donde se evaluaron cuatro sensores comerciales y métodos analíticos (kit de valoración, método reflectométrico, sensor amperométrico y sensor cronoamperométrico), utilizando en este caso el sensor cronoamperométrico como método de referencia (**Figura 4.3**). En este caso, el kit de valoración confirmó la sobreestimación de la concentración de PAA

para casi todos los niveles de COT. En cuanto al método reflectométrico, éste no mostró diferencias significativas en comparación con el sensor cronoamperométrico. Sin embargo, es necesario señalar que en este ensayo no se alcanzaron concentraciones de materia orgánica tan elevadas como en el ensayo descrito anteriormente, a partir de las cuales se observó la sobreestimación en la concentración de PAA con esta metodología (COT 1200 mg L⁻¹) (**Figura 4.2**). Por último, el sensor amperométrico no mostró diferencias significativas cuando se comparó con el sensor cronoamperométrico.

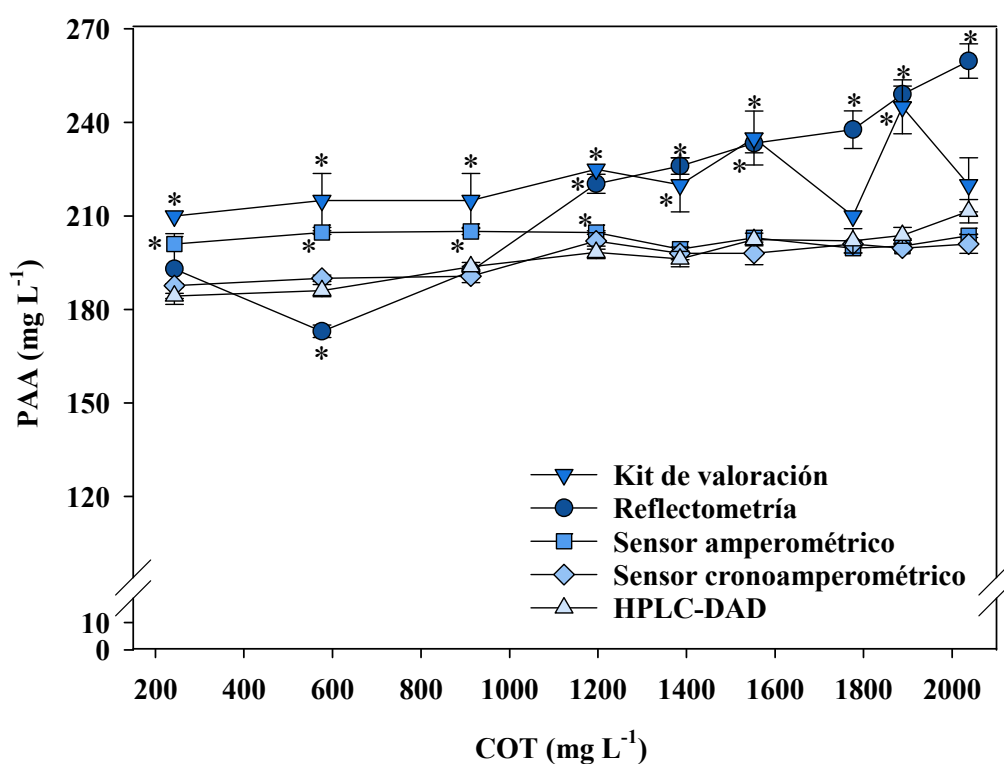


Figura 4.2. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de manzana utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de COT, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

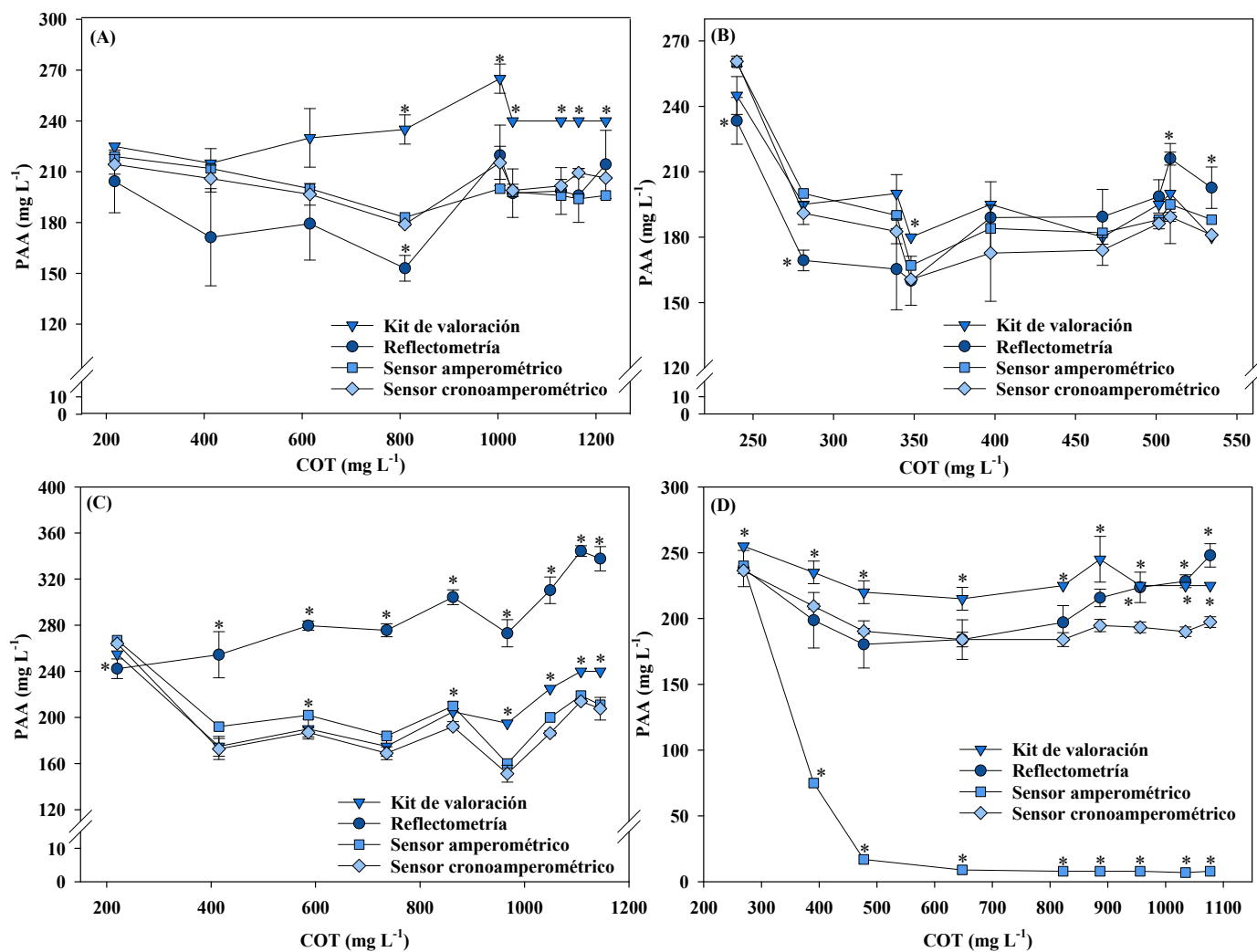


Figura 4.3. Cuantificación del ácido peracético (PAA) en un segundo ensayo en agua de lavado de manzana (A), tomate (B), pimiento (C) y limón (D). Para cada nivel de COT el asterisco indica diferencias significativas de cada metodología con el sensor cronoamperométrico, según la prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.1.4. Monitorización del PAA en agua de lavado de tomate

Cuando se compararon las distintas metodologías para la determinación del PAA en agua de lavado de tomate, se observó que, inicialmente, la concentración de PAA disminuyó (COT 380 mg L⁻¹) debido al consumo de este desinfectante en la oxidación de la materia orgánica creciente en el tanque de lavado, excepto con el kit de valoración, el cual sobreestimó significativamente la concentración de PAA (**Figura 4.4**). Tal y como se puede observar, tanto el kit de valoración como el método reflectométrico sobreestimaron la concentración de PAA para casi todos los niveles de COT, en un 12% y 13%, respectivamente. Asimismo, al igual que ocurrió con el agua de lavado de manzana, el método reflectométrico sobreestimó la concentración de PAA a partir de un determinado nivel de materia orgánica (COT 550 mg L⁻¹), aumentando la sobreestimación conforme lo hacía la materia orgánica (**Figura 4.4**). Además, los sensores amperométrico y cronoamperométrico no mostraron diferencias significativas cuando se compararon con la metodología de referencia (HPLC-DAD), para todos los valores de COT (**Figura 4.4**). Estos resultados confirman la veracidad y precisión de los sensores amperométrico y cronoamperométrico para las determinaciones de PAA comparados con el kit de valoración y el método reflectométrico. Cuando en un segundo ensayo se compararon el kit de valoración, el método reflectométrico, el sensor amperométrico y el sensor cronoamperométrico, se observaron diferencias significativas entre método reflectométrico y el sensor cronoamperométrico, sobreestimando la concentración a partir de un nivel de COT de 500 mg L⁻¹ (**Figura 4.3**).

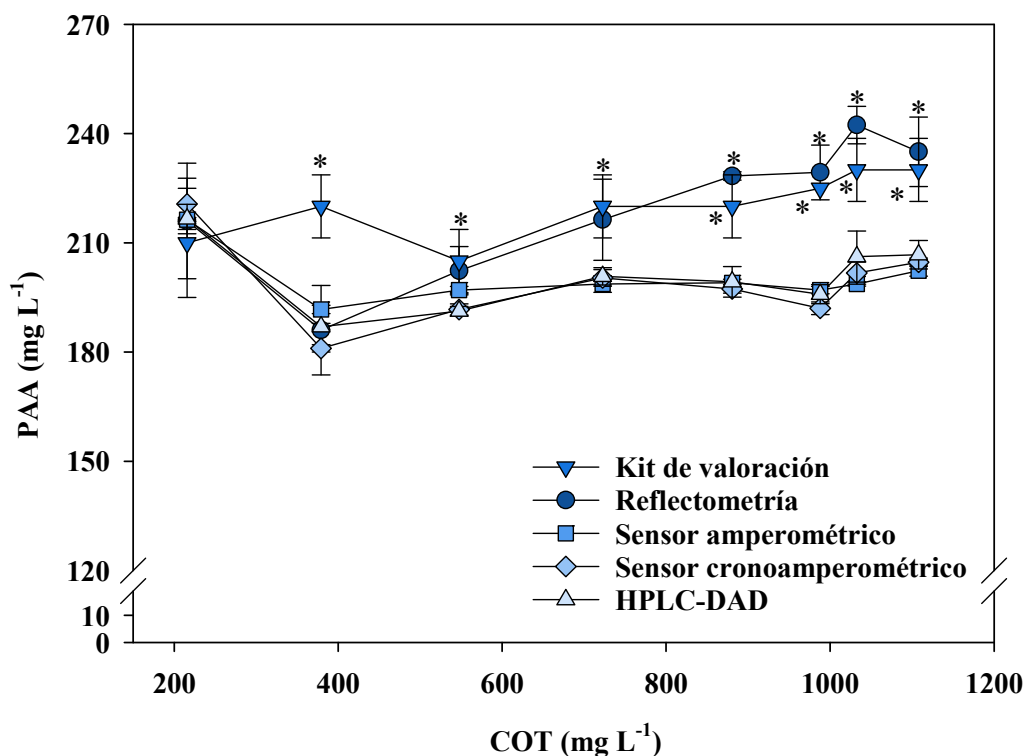


Figura 4.4. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de tomate utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de COT, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.1.5. Monitorización del PAA en agua de lavado de pimiento

Las determinaciones para el COT en el agua de lavado de pimiento mostraron una respuesta que no fue proporcional al aumento de la materia orgánica en el tanque de lavado debido, probablemente, a interferencias que los pigmentos u otros compuestos procedentes de la piel y/o exudados del tejido ocasionaron en las determinaciones fotométricas. Por este motivo, la monitorización de la materia orgánica en el tanque de lavado se realizó mediante el análisis de la DQO, no mostrando esta determinación interferencias en sus mediciones. Asimismo, cuando se determinó la concentración residual de PAA con las distintas metodologías estudiadas, se observó la misma tendencia

que para el agua de tomate, pero de manera más pronunciada (**Figura 4.5**). Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos por HPLC-DAD y el kit de valoración y el método reflectométrico. En concreto, la concentración de PAA se sobrestimó en un 17% cuando se utilizó el kit de valoración. Esta sobreestimación fue mucho más acusada, de un 48%, para el método reflectométrico, en este caso para todos los niveles de DQO, aunque aumentó a medida que lo hacía la concentración de materia orgánica en el tanque de lavado (**Figura 4.5**). De manera general, las medidas realizadas con el sensor amperométrico fueron similares a las realizadas mediante HPLC-DAD, con sólo una medida que difería significativamente con esta metodología de referencia (**Figura 4.5**). Asimismo, resultó destacable que no hubo diferencias entre las mediciones realizadas con el sensor cronoamperométrico y aquellas realizadas mediante HPLC-DAD. En el segundo ensayo realizado se observó una tendencia similar cuando se compararon las distintas metodologías, aunque en este caso el kit de valoración sobrestimó la concentración de PAA únicamente para niveles altos de materia orgánica. En este ensayo, debido a las interferencias explicadas en la determinación de la COT, así como a la falta de disponibilidad de las determinaciones de DQO, se realizó una estimación del aumento progresivo de los valores de COT en el tanque de lavado, atendiendo a los valores experimentales iniciales y finales y a la tendencia observada para el resto de productos (**Figura 4.3**).

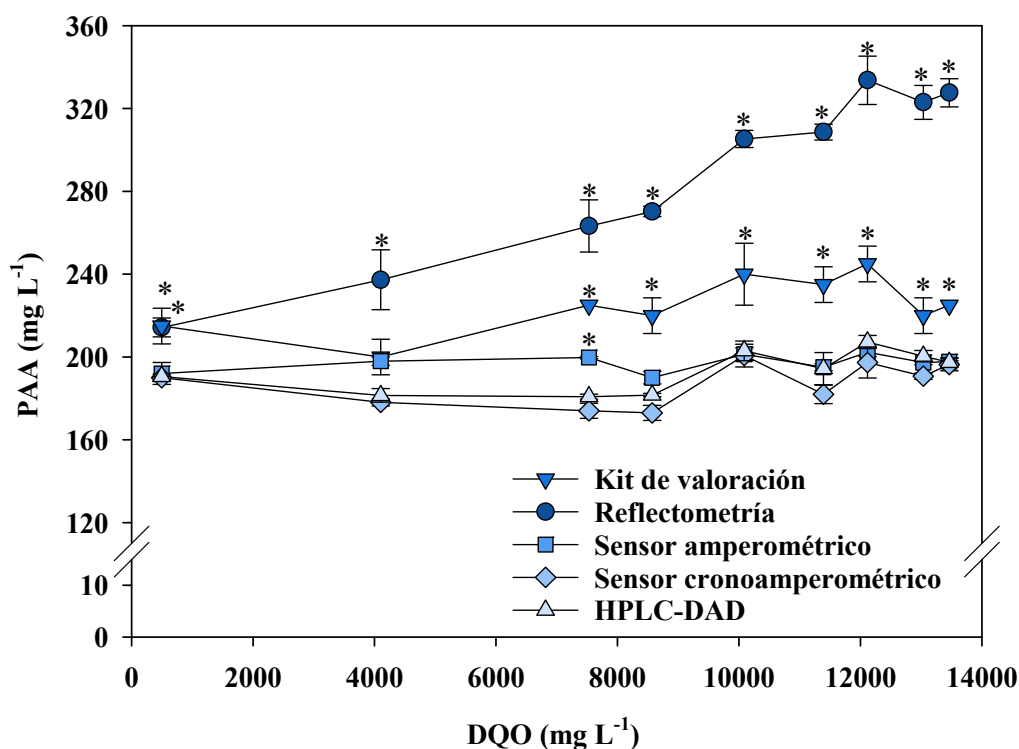


Figura 4.5. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de demanda química de oxígeno (DQO) en agua de lavado de pimiento utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de DQO, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.1.6. Monitorización del PAA en agua de lavado de limón

Los resultados para la monitorización del PAA en agua de lavado de limón, utilizando distintas metodologías para ello, mostraron que el kit de valoración sobrestimó la concentración de PAA, específicamente en niveles medios y bajos de materia orgánica (COT 200-400 mg L⁻¹) (**Figura 4.6**). En este caso, el método reflectométrico mostró, en la mayoría de los casos, valores similares de PAA en comparación con la metodología por HPLC-DAD (**Figura 4.6**). En el otro ensayo realizado se confirmaron los resultados para el kit de valoración, el cual sobreestimó la concentración de PAA para casi todos los niveles de COT. Asimismo, en este último ensayo se alcanzó una concentración superior

de COT en el tanque de lavado (520 vs 1070 mg L⁻¹), mostrando en este caso el método reflectométrico la sobreestimación de la concentración de PAA en las altas concentraciones de COT (**Figura 4.3**). Por otra parte, el sensor cronoamperométrico mostró una veracidad y precisión adecuadas para la determinación del PAA en agua de lavado de limón, no observándose diferencias significativas cuando se comparó con la metodología por HPLC-DAD, y mostrando esta metodología la mayor selectividad para la determinación de este desinfectante y sin interferencias con la materia orgánica del agua de lavado (**Figura 4.6**). En cuanto al sensor amperométrico, los resultados mostraron que las mediciones realizadas con este método se vieron afectadas por la matriz, mostrando una subestimación progresiva de las determinaciones de PAA con el aumento de la materia orgánica en el tanque de lavado (**Figura 4.6**). En el segundo ensayo realizado, en este caso con el doble de concentración de COT (520 vs 1070 mg L⁻¹), se confirmó que este sensor tuvo un claro efecto matriz en la determinación del PAA, no pudiendo medir los niveles de este desinfectante a altas concentraciones de COT (>600 mg L⁻¹) (**Figura 4.3**).

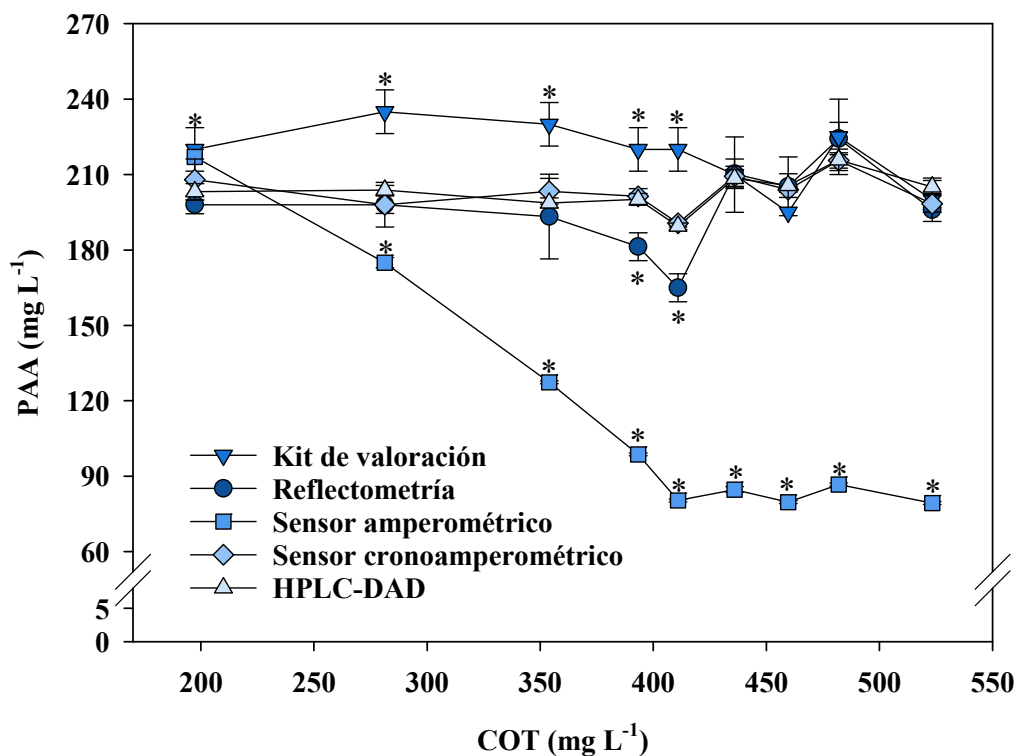


Figura 4.6. Cuantificación del ácido peracético (PAA) al aumentar el contenido de carbono orgánico total (COT) en agua de lavado de limón utilizando diferentes metodologías. Para cada nivel de DQO, el asterisco indica diferencias significativas en la comparación de cada metodología con los resultados por HPLC-DAD, de acuerdo con la prueba t de Student ($p < 0.05$).

2.2. Comparación de metodologías para el control y monitorización de cloro

Para la comparación de sensores y métodos analíticos para la determinación del cloro libre proveniente de la desinfección con NaOCl, los datos se agruparon atendiendo a la metodología de medición utilizada, desde el primer punto de entrada del agua de lavado en el tanque, hasta el máximo nivel de materia orgánica alcanzado en el agua de lavado para cada uno de los ensayos. Para todos los ensayos realizados, los parámetros físico-químicos se mantuvieron en el siguiente rango: pH (5.0-6.0) T^a (5.3-5.3°C) y ORP (738-969 mV). Asimismo, a diferencia de la comparación de metodologías para la determinación del PAA, en este estudio no se utilizó una metodología como referencia,

sino que, una vez agrupados los datos, se compararon las distintas metodologías mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y cuando se observaron diferencias significativas mediante la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$). Tal y como se puede observar en los resultados, no se observaron diferencias significativas en la cuantificación de cloro libre entre las seis metodologías en la matriz de agua sin demanda de cloro (sin materia orgánica), confirmando la idoneidad de las seis metodologías para la determinación de este desinfectante en la matriz estudiada (**Figura 4.7**). En cuanto a la comparación de estas metodologías en agua de lavado de los productos cortados (lechuga, col y cebolla), los resultados mostraron que, aunque existieron ligeras diferencias en cuanto a la determinación y cuantificación del cloro, no fueron estadísticamente significativas, excepto para el sensor amperométrico, el cual sobreestimó ampliamente la concentración de cloro libre en las matrices estudiadas. Asimismo, la sobreestimación de los niveles de cloro libre con esta metodología aumentó conforme lo hacía la materia orgánica del agua de lavado. Por este motivo se puede apreciar una alta desviación estándar en el conjunto de los resultados de cloro libre analizados con esta metodología (**Figura 4.7**).

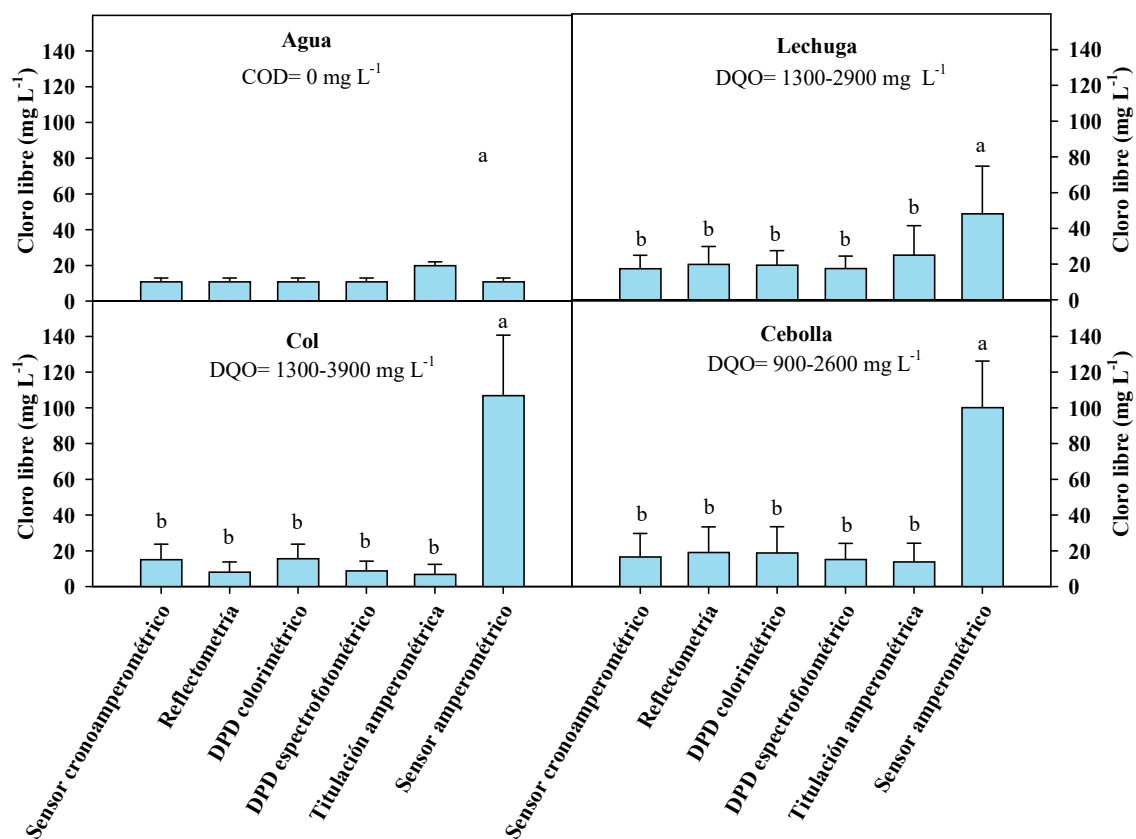


Figura 4.7. Cuantificación de cloro libre utilizando diferentes metodologías en agua sin demanda de cloro y en agua de lavado de lechuga, col lombarda y cebolla cortadas, al aumentar el contenido en materia orgánica medido como demanda química de oxígeno (DQO). Para cada uno de los ensayos, se muestran los resultados entre los valores iniciales y finales de DQO alcanzados en el tanque de lavado. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de nueve réplicas, para el agua sin demanda de cloro y al valor promedio \pm desviación estándar de veinticuatro réplicas para lechuga, col lombarda y cebolla. Las diferentes letras muestran diferencias significativas en la comparación de las distintas metodologías, de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$).

2.3. Potencial de oxidación-reducción (ORP) y su relación con la concentración de cloro libre

En cuanto al estudio sobre el potencial de oxidación-reducción (ORP) y su relación con la concentración de cloro libre presente en el agua de lavado para determinar si la medida de ORP podría ser un parámetro efectivo para el control y la monitorización de cloro, los resultados mostraron que, a concentraciones bajas de cloro libre, el valor de ORP aumentó con la concentración de éste (**Figura 4.8**). Así, se produjo un gran aumento de los valores de ORP con un ligero aumento en la concentración de cloro libre. Bajos niveles de cloro libre ($0.1-6 \text{ mg L}^{-1}$) produjeron un rápido aumento de los valores de ORP ($>600 \text{ mV}$). Sin embargo, a partir de una cierta concentración de cloro libre ($5-6 \text{ mg L}^{-1}$) los valores de ORP son elevados ($710-910 \text{ mV}$) sin relación con la concentración de cloro (**Figura 4.8**). Estos resultados demostraron que el valor de ORP no puede ser utilizado para medir y controlar los niveles de cloro libre en el agua de lavado ya que, a partir de una cierta concentración de cloro, distintas concentraciones de cloro libre presentan un mismo valor de ORP.

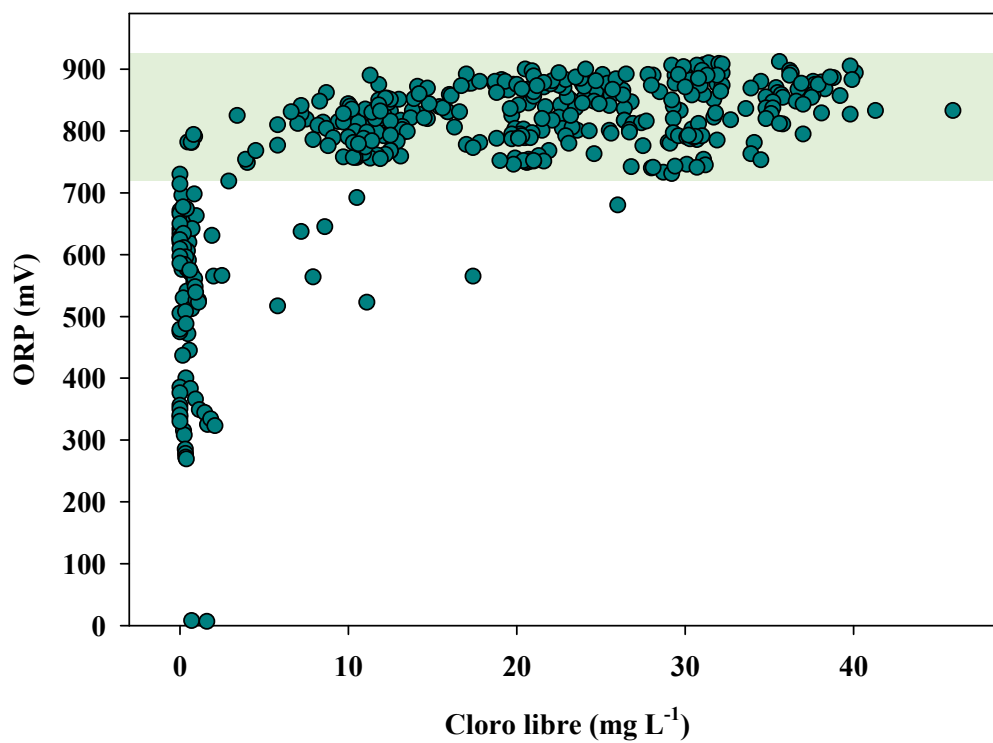


Figura 4.8. Medición del potencial de oxidación-reducción (ORP) para distintas concentraciones de cloro libre a pH constante (5.0-6.0), en agua de lavado de distintos productos (lechuga iceberg, cebolla y col cortadas, así como brotes tiernos). Los valores corresponden a 474 mediciones.

3. DISCUSIÓN

Mediante la desinfección del agua que se emplea en las operaciones de manipulación y procesamiento posteriores a la cosecha de frutas y hortalizas se pueden prevenir los peligros microbiológicos asociados a su uso, pudiendo aumentar por más tiempo la utilización de la misma y reducir la cantidad total de agua necesaria principalmente en las etapas de prelavado y lavado (Manzocco y col., 2015). De manera general, en función de las características de la planta procesadora y para cada línea de procesado es variable la frecuencia con que cambian el agua de lavado. Dependiendo de la empresa, el volumen de tanque lo pueden sustituir cada hora, o bien a lo largo de una jornada de 8 horas reponiendo con agua limpia hasta alcanzar el nivel, incluso mantenerlo hasta varios meses. Si los parámetros operacionales relacionados con la desinfección del agua de proceso, como es la medida de la concentración residual de desinfectante, no se realiza adecuadamente, la renovación podría ser más frecuente de lo necesario, incrementando los volúmenes consumidos, así como las aguas residuales generadas. El desinfectante utilizado actúa oxidando los compuestos presentes en el agua de lavado, principalmente materia orgánica, pero también compuestos inorgánicos, y en el caso del cloro puede incluso formar compuestos secundarios, como pueden ser las cloraminas y los DBPs, reduciendo la concentración residual del mismo, y pudiendo provocar una dosificación descontrolada y variable del desinfectante en el agua de proceso (Gil y col., 2014). Este hecho puede comprometer la seguridad microbiológica, donde la cantidad y el tipo de materia orgánica presente en el agua de lavado, dependiendo esto último del tipo de producto lavado, influyen en la demanda de desinfectante (Teng y col., 2021). En este sentido, el mantenimiento de la concentración residual del desinfectante dentro de los límites operacionales requeridos es el principal parámetro a tener en cuenta durante la desinfección del agua de lavado, por lo que las plantas procesadoras deben disponer de

metodologías de medición de estos desinfectantes, las cuales den resultados exactos por su selectividad y que no muestren interferencias con los posibles compuestos presentes en el agua de lavado, además de ser rápidos, sencillos de utilizar por el personal de la planta y relativamente económicos, de manera que se lleve a cabo la monitorización en continuo del desinfectante y el efectivo control en todo momento del proceso de desinfección (Gombas y col., 2017). Son muchas las metodologías descritas en la bibliografía para la determinación del PAA y del cloro, destacando métodos cromatográficos, electroquímicos, fotométricos, titulaciones, siendo algunas de las metodologías más utilizadas aquellas basadas en la oxidación del N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) y la posterior detección del compuesto coloreado formado, valoraciones yodométricas o técnicas electroquímicas basadas en amperometría (Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología de Productos Químicos [ECETOC], 2001; Desiderio y Nibbering 2010; Saputro y col., 2012; Gombas y col., 2017; Sode, 2019).

En el caso del cloro, aunque el mantenimiento de la concentración residual de desinfectante es el parámetro más crítico a tener en cuenta durante la desinfección del agua de proceso, también hay que tener en consideración otros parámetros tales como el pH para que la concentración de la especie con mayor capacidad antimicrobiana (HOCl) sea máxima (Deborde y von Gunten, 2008). A razón de esto, para asegurar un proceso de desinfección efectivo, el pH en el tanque de lavado se mantuvo entre 5.0 y 6.0 en los ensayos con NaOCl, en las cuatro matrices estudiadas. Sin embargo, el control del pH no es un parámetro tan crítico en la desinfección con PAA, siempre y cuando no se establezcan condiciones alcalinas a $\text{pH} > 9.0$ (Kitis, 2004). Asimismo, durante los ensayos realizados con PAA, el pH fue siempre bajo ($\text{pH} < 4.9$). Igualmente, la cantidad de materia orgánica influye directamente en la demanda del desinfectante, siendo las determinaciones de COT y DQO las que permiten monitorizar la carga orgánica del agua

de lavado, aunque tienen la limitación del tiempo que requieren en la determinación (Gombas y col., 2017; Teng y col., 2021). La absorbancia del agua a una longitud de onda de 254nm (UV₂₅₄) también se ha correlacionado con la carga orgánica, en concreto con los sólidos totales disueltos presentes en el agua de lavado, pudiendo utilizarse para la monitorización de la demanda de desinfectante y para ayudar a conocer la necesidad de la renovación en los tanques de lavado de las líneas de proceso (Ramos-Ascue, 2018; Chen y Hung, 2016). Asimismo, es necesario mencionar que el PAA, al ser un ácido orgánico, incrementa la carga orgánica del agua de lavado. Esta contribución se observó en los primeros puntos de muestreo, donde el agua de lavado partía de un contenido en materia orgánica aportado por el desinfectante. Asimismo, también sería necesario apuntar las interferencias en las mediciones de COT en el agua de lavado de pimiento durante la monitorización de la materia orgánica. Cuando se realizaron las determinaciones de COT en esta matriz, no se obtuvo una respuesta proporcional al aumento progresivo de la materia orgánica en el tanque de lavado del sistema dinámico. Estas determinaciones mostraron una variabilidad muy grande sin una tendencia clara. Durante el análisis del COT los compuestos que contienen carbono son transformados en dióxido de carbono y posteriormente detectados fotométricamente con la ayuda de una solución indicadora (MerckMillipore, 2021a). Los pigmentos u otros compuestos procedentes de los exudados del tejido del pimiento tras los daños causados durante la preparación del agua de lavado permanecerían en el agua y podría haber interferido en las determinaciones fotométricas. Sin embargo, la búsqueda bibliográfica no ha podido identificar exactamente a qué se deben estas interferencias. Por este motivo, a diferencia de las otras tres matrices evaluadas en este estudio (agua de manzana, tomate y limón), la determinación de la materia orgánica en el agua de pimiento se realizó mediante la DQO, la cual no presentó interferencias en sus medidas.

En cuanto a la determinación de PAA en el agua de lavado mediante la comparación de sensores comerciales y métodos analíticos de medida, los ensayos llevados a cabo determinaron que el análisis por HPLC-DAD demostró una alta selectividad para la determinación y cuantificación del PAA en agua de proceso, basado en su determinación de forma indirecta mediante la oxidación del grupo sulfuro de la sustancia colorimétrica ADS al correspondiente sulfóxido (ADSO) y su posterior detección mediante HPLC-DAD. Ambas formas (ADS y ADSO) mostraron una perfecta separación cromatográfica, siendo identificadas inequívocamente mediante su espectro de absorbancia, con máximos a una λ de 427 y 410 nm para ADS y ADSO, respectivamente. Asimismo, esta metodología no mostró interferencias debidas a las posibles sustancias presentes en el agua de proceso o en la solución comercial de PAA. Pinkernell y col. (1996), publicaron una metodología similar basada en la oxidación del sulfuro de metil p-tolil (MTS) a su correspondiente sulfóxido (MISO), y su posterior detección a una λ de 230 nm. Sin embargo, a esa longitud de onda otros compuestos liberados del tejido vegetal podrían presentar absorbancia, interfiriendo en las determinaciones y resultando en este caso una metodología inadecuada para matrices de agua de proceso. En cambio, la metodología de HPLC-DAD utilizada en este estudio ofrece alta selectividad, utilizando radiación UV de onda larga ($\lambda=410$ nm), sin la interferencia de posibles compuestos orgánicos presentes en estas matrices complejas, como son las aguas de proceso estudiadas. Asimismo, los compuestos utilizados (ADS/ADSO) han sido descritos como altamente selectivos para los peroxoácidos, mostrando pocas interferencias con otras sustancias oxidantes, tales como el H_2O_2 , presente en la solución comercial de PAA (Effkemann y Karst, 1998; Sode, 2019). Sin embargo, con esta metodología la máxima concentración de PAA que pudo ser calculada utilizando una regresión lineal simple fue de 0.185 mM (14 mg L⁻¹), por lo que las

muestras tuvieron que ser diluidas para su análisis, aumentando el tiempo requerido para el mismo. En definitiva, esta metodología resultó exacta y selectiva para la determinación y cuantificación del PAA en agua de proceso, siendo adecuada para ser utilizada como método de referencia para la comparación del resto de metodologías estudiadas. Sin embargo, no es una metodología apropiada para la monitorización del PAA en una planta de procesado debido a que no se dispone del equipamiento requerido, además del tiempo necesario para realizar el análisis, la necesidad de personal altamente cualificado, o bien el elevado coste que conlleva el subcontratarlo con un laboratorio externo.

Otra de las metodologías estudiadas para la determinación del PAA en agua de proceso fue un kit comercial de valoración, consistente en una titulación yodométrica donde el PAA oxida el yoduro a yodo, y el yodo es valorado utilizando tiosulfato de sodio, en presencia de un indicador de almidón (Donabed, 2018). Los resultados mostraron que esta metodología podría no ser un método apropiado para la determinación del PAA en las matrices estudiadas (manzana, tomate, pimiento y limón). Las concentraciones del desinfectante se sobreestimaron en los ensayos llevados a cabo para la determinación del PAA en el agua de lavado entre las concentraciones obtenidas con el kit de valoración con respecto a la metodología de referencia (HPLC-DAD), mostrando diferencias estadísticamente significativas a medida que aumentaba la concentración de materia orgánica en el tanque de lavado. Se alcanzaron diferencias entre ambas metodologías de hasta un 12% y un 17%, en agua de lavado de tomate y pimiento, respectivamente, para todos los valores de materia orgánica estudiados. Las interferencias observadas en la utilización de esta metodología pudieron deberse a la presencia de H_2O_2 en la solución comercial de PAA, el cual se encuentra en una proporción incluso mayor a la del PAA. Este peróxido, aunque no tan potente como el PAA también es un buen oxidante, por lo que puede interferir en la valoración yodométrica, oxidando el yoduro de potasio (KI) y

sobreestimando la concentración de PAA calculada. El H_2O_2 reacciona mucho más lentamente con el yoduro que el PAA y, aunque su contribución al incremento de la concentración de PAA no es cuantitativamente muy elevada, debe ser tomada en consideración. Asimismo, la coexistencia del PAA en solución comercial con el H_2O_2 hace que las metodologías descritas para la determinación del PAA requieran ser altamente selectivas para este desinfectante, evitando las interferencias generadas por este peróxido (González-Aguilar, y col., 2012; Domínguez-Henao y col., 2018b; Sode, 2019). Las interferencias con posibles oxidantes están contempladas en el protocolo del kit comercial de valoración. Donabed (2018) propone la determinación del PAA con la utilización de kits de valoración que utilicen un catalizador que acelera la reacción del H_2O_2 con el yoduro, determinando la cantidad total de PAA y H_2O_2 y calculando la concentración de PAA, con un factor de corrección en función de la proporción de PAA en cada producto comercial. También se han descrito otras metodologías de titulación donde se tiene en cuenta la contribución del H_2O_2 (Greenspan y Mackellar, 1948; Sully y Williams, 1962; Edaal y Bernatek, 1963; Cavallini y col., 2013). Asimismo, la adición de catalasa podría evitar las interferencias generadas por el H_2O_2 . Sin embargo, aunque hay algunas publicaciones que establecen que la adición de catalasa no afecta al PAA, otras concluyen que esta enzima podría afectar a este desinfectante, pudiendo subestimar la concentración del mismo (ECETOC, 2001; Wagner y col., 2002; Domínguez-Henao y col., 2018b). Es de destacar que los resultados obtenidos en la determinación del PAA con el kit de valoración mostraron una alta desviación estándar en algunas de las mediciones realizadas e incluso algunos puntos con valores atípicos, posiblemente debido a variaciones experimentales en la determinación del punto final de la valoración o incluso en los cálculos del número de gotas, poniendo en evidencia la necesidad de contar con personal especializado si esta metodología se utiliza en una planta de procesado.

Asimismo, la necesidad de diluir las muestras previo a su análisis aumentó el tiempo necesario para esta metodología.

En cuanto a la utilización del método reflectométrico para la determinación del PAA, aunque resultó una metodología rápida, sin necesidad de una preparación previa de la muestra, ni tan subjetiva en la determinación del PAA como el kit de valoración, los resultados mostraron la sobreestimación de la concentración de PAA en las matrices de agua de lavado cuando se comparó con los resultados obtenidos con la metodología de referencia (HPLC-DAD), siendo de un 13% para agua de lavado de tomate y de un 47 % en el pimiento. Esta metodología consiste en la aplicación de tiras reactivas y la posterior lectura reflectométrica, donde el PAA oxida un derivado del fenol, dando lugar a una coloración que se determina reflectométricamente, consiguiendo selectividad para la determinación del PAA (Fischer, 1990; Pinkernell y col., 1997, ECETOC 2001). En este sentido, las diferencias en la determinación del PAA entre esta metodología y el método de HPLC-DAD son cuantitativamente más relevantes en el caso del pimiento, donde se sobreestima la concentración de PAA con el aumento de materia orgánica, aumentando las diferencias entre esta metodología y la de referencia, con el incremento de la DQO. En el resto de matrices estudiadas, aunque no existen diferencias tan notables en la determinación del PAA, se observa una ligera sobreestimación de la concentración de PAA a partir de un determinado nivel de materia orgánica en el tanque de lavado, como es la COT de 1200 mg L⁻¹ en manzana y de 550 mg L⁻¹ en tomate. Estos resultados podrían indicar que compuestos orgánicos procedentes del producto vegetal, especialmente exudados provenientes de daños por golpes, o incluso la presencia de pesticidas presentes en el agua de lavado, podrían interferir en las lecturas reflectométricas, sobreestimando la concentración del PAA. Asimismo, con el aumento de la materia orgánica también se produce un aumento en la dosificación del PAA, y en consecuencia de H₂O₂. Este

peróxido también podría interferir en la oxidación del sustrato cromogénico presente en las tiras desechables que posteriormente se miden reflectométricamente. Estas interferencias se encuentran descritas para valores de H_2O_2 por encima del 2% (MerckMillipore, 2021b). Por otra parte, los errores experimentales durante la realización de las determinaciones, tales como el tiempo de inmersión de las tiras reactivas en la muestra, la eliminación del exceso de líquido de la tira, o el tiempo en la realización de la lectura, podrían interferir en la medida de las determinaciones realizadas con esta metodología (Gombas y col., 2017). Asimismo, López-Gálvez y col. (2020), también compararon tres métodos analíticos para la determinación del PAA en agua de lavado de pimiento procedente de una línea comercial. Utilizaron un método reflectométrico, un sensor amperométrico y un sensor cronoamperométrico. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la determinación del PAA cuando se compararon el sensor amperométrico y cronoamperométrico, aunque señalaron que el método reflectométrico subestimó la concentración de PAA para el agua de lavado de pimiento. Sin embargo, es necesario señalar que estas diferencias no fueron cuantitativamente significativas, mostrando los resultados para la determinación del PAA, en el conjunto de muestras analizadas, medianas de 359 ± 76 , 367 ± 89 y $323 \pm 60 \text{ mg L}^{-1}$ para el sensor amperométrico, cronoamperométrico y el método reflectométrico, respectivamente. Asimismo, el contenido en materia orgánica del agua de lavado de pimiento analizada por estos autores (DQO 3145 mg L^{-1}) era mucho menor que la determinada en este estudio (DQO $490\text{--}13500 \text{ mg L}^{-1}$), por lo que las interferencias en las lecturas reflectométricas derivadas del considerable aumento de materia orgánica en el tanque de lavado, y especialmente debidas a los exudados liberados de estos productos, no pudieron ser profundamente analizadas por estos autores.

Por otra parte, los métodos electroquímicos basados en la reducción electroquímica del PAA presentaron una detección selectiva de este desinfectante en presencia de H_2O_2 , debido a la diferencia entre los potenciales de oxidación de este peróxido y del PAA. Dentro de estas metodologías, fueron dos las técnicas amperométricas que se compararon en la determinación del PAA en el agua de lavado de las cuatro matrices estudiadas. Estas técnicas presentan la ventaja de que no necesitan una preparación previa de la muestra, permitiendo la medición del desinfectante “in situ” (Sode, 2019). El sensor amperométrico mostró una exactitud adecuada para la determinación del PAA en todas las aguas de lavado estudiadas, excepto en el agua de lavado de limones, donde esta metodología dejó de medir la concentración de PAA de forma gradual, conforme se ensuciaba el agua lavado. Si bien es cierto que para el control del desinfectante en el agua de lavado es preferible una monitorización en continuo para el control del nivel residual de desinfectante (Gombas y col., 2017), esta metodología, resultó adecuada para la mayoría de las matrices estudiadas, aunque presentó interferencias considerables para el agua de lavado de limón. Tal y como se ha descrito anteriormente, esta sonda está formada por un sensor de medida protegido por una membrana semipermeable, la cual permite la difusión del PAA. Estudios posteriores realizados en el grupo demostraron que las interferencias con el sensor amperométrico podrían deberse a la presencia de compuestos orgánicos, como los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales provenientes de la piel dañada del limón, los cuales pasarían al agua de lavado y bloquearían la membrana semipermeable de la sonda, impidiendo la difusión del PAA a través de ella y no siendo detectado en el electrodo de medida. Asimismo, también se comprobó que esta situación es reversible y la membrana se puede regenerar después de un lavado persistente. Sin embargo, fue el método cronoamperométrico el que demostró la mayor exactitud para la monitorización del PAA

en el agua de lavado de las cuatro matrices estudiadas. En ninguna de las matrices se observaron diferencias significativas en la determinación de este desinfectante cuando esta metodología se comparó con el método de referencia (HPLC-DAD). Denggerile y col. (2004), compararon electrodos de diferentes materiales en la determinación del PAA en presencia de H_2O_2 , demostrando que la electroreducción del PAA es altamente dependiente del material estudiado. El sensor cronoamperométrico utiliza materiales altamente selectivos en la determinación de PAA en presencia de H_2O_2 (Comunicación personal, Palintest). Asimismo, esta metodología tampoco mostró interferencias con la materia orgánica, color o turbidez de las cuatro matrices estudiadas (manzana, tomate, pimienta y limón), presentando este sensor desechable de un solo uso, una alta especificidad para el control y la monitorización de este desinfectante en el agua de proceso de la industria hortofrutícola. Es una metodología rápida y sencilla de utilizar, la cual puede ser empleada “in situ” en la línea de procesado, obteniendo resultados objetivos. Asimismo, es relativamente económica y permite la determinación de un amplio rango de concentraciones de PAA, sin necesidad de diluir la muestra (Palintest, 2022a).

En la determinación de cloro, los resultados de la comparación de sensores comerciales y métodos analíticos mostraron la idoneidad de las seis metodologías sin diferencias significativas entre ellas en agua sin materia orgánica. Los métodos colorimétrico, espectrofotométrico y la metodología de valoración amperométrica, se consideran métodos estándar para el análisis de cloro en agua de bebida y en aguas residuales (APHA, 2014). Sin embargo, en este caso, y a diferencia del estudio llevado a cabo para la determinación del PAA, ninguna de las metodologías estudiadas fue utilizada como referencia. Asimismo, para el resto de matrices estudiadas, fue el sensor amperométrico el que presentó diferencias en cuanto a la determinación del cloro libre,

sobreestimando las concentraciones en todos los casos. Si bien es cierto que esta metodología permite una monitorización en continuo de los niveles de desinfectante para su control operacional en las líneas de proceso de la industria hortofrutícola, resultan evidentes las interferencias del sensor, bien con la presencia de compuestos disueltos o en suspensión provenientes del vegetal o de los exudados de los productos cortados, provocando en este caso la sobreestimación de los resultados con respecto al resto de metodologías. Asimismo, aunque los resultados no mostraron diferencias significativas entre el resto de metodologías, no todas resultan igual de adecuadas y precisas para la determinación del cloro libre en una línea de procesado. Aunque el método colorimétrico del DPD, así como la valoración amperométrica son metodologías ampliamente reconocidas y utilizadas (Desiderio y Nibbering, 2010; Saputro y col., 2012; APHA, 2014; Gombas y col., 2017) ambas requieren un tiempo relativamente largo de análisis. Aunque el método colorimétrico del DPD es más sencillo en su realización, la titulación amperométrica requiere una mayor habilidad por parte del operador para el establecimiento del punto final de la titulación (Harp, 2019), así como la necesidad de equipos específicos para llevar a cabo esta metodología. Asimismo, la rápida agitación que realizan algunos valoradores podría producir la pérdida de cloro en la muestra a evaluar (OmegaPeru, 2020). En cuanto al método reflectométrico, el cual se basa también en la oxidación del DPD, no presentó las mismas interferencias que para la determinación del PAA, permitiendo esta metodología la realización de mediciones de cloro libre “in situ”. Sin embargo, para su utilización sería necesario un entrenamiento previo del operador, ya que en caso contrario podría derivar en errores experimentales en el manejo de las tiras reactivas y la realización de las mediciones (Gombas y col., 2017). Por otra parte, el método espectrofotométrico del DPD consiste en una metodología simplificada del método DPD colorimétrico, utilizando un kit comercial de medida y siendo

ampliamente utilizada en la determinación de cloro libre y cloro total en diferentes matrices de agua de proceso (Gil y col., 2016; López-Gálvez y col., 2018; López-Gálvez y col., 2019; Tudela y col., 2019a;2019b). Sin embargo, todas las metodologías descritas requieren una dilución previa de la muestra, aumentando el tiempo de análisis requerido, así como los posibles errores experimentales que esta práctica conlleva. Por tanto, aunque la mayoría de las metodologías descritas serían adecuadas para la determinación efectiva de los niveles residuales de cloro libre en agua de lavado, el método cronoamperométrico resultó el método más sencillo, rápido de utilizar, sin la necesidad de preparación previa de la muestra ni la realización de diluciones y, por tanto, adecuado para la monitorización “in situ” de los niveles de desinfectante en la línea de procesado. Una de las desventajas de esta metodología reside en que no proporciona una medición automática para la determinación efectiva del desinfectante en el agua de lavado, necesaria para la dosificación y el control automático de los parámetros críticos durante el proceso de desinfección.

Por último, en cuanto al estudio del potencial de oxidación-reducción (ORP) en la desinfección con cloro, este parámetro además de indicar el potencial de desinfección que tiene el agua, se ha intentado utilizar para la dosificación de cloro, ya que en algunas publicaciones se describía su correlación con la concentración de cloro libre presente en el agua de lavado (Spahl, 2012). Sin embargo, otros autores defienden la falta de correlación entre este parámetro y algunos desinfectantes oxidantes como el PAA y el H_2O_2 (Suslow, 2004). En este sentido, se estudió la relación entre el ORP y la concentración de cloro libre, no observando una correlación entre ambos parámetros, a partir de una cierta concentración de cloro. Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, muestran que el valor de ORP no puede utilizarse como parámetro de monitorización del cloro libre presente en el agua de lavado, ya que al mismo valor de

ORP le corresponde concentraciones de cloro libre muy diferentes, a pesar del control de pH (pH=5.0-6.0). En concreto, se observa que, a concentraciones bajas de cloro libre, el valor de ORP aumenta con la concentración de éste, sin embargo, el valor de ORP se estabiliza a partir de una cierta concentración de cloro. Los resultados obtenidos por Desiderio y Nibbering (2010) también mostraron la estabilización del ORP a concentraciones muy bajas de cloro libre. Asimismo, Van Haute y col. (2019), realizaron diversos estudios sobre la influencia de los distintos parámetros en los valores de ORP y concluyeron que, en el proceso de desinfección con cloro, los valores de ORP pueden ser dependientes de la cantidad de cloro libre presente en el agua, pero también influye la temperatura, el pH, así como el tipo de regulador de pH y los constituyentes de la matriz del agua de lavado. Con respecto a la relación entre la concentración de cloro libre y los valores de ORP, estos autores establecieron que el aumento de los valores de ORP se relacionan con el aumento del cloro libre a concentraciones bajas, pero la sensibilidad de la señal de ORP para la determinación de cloro libre disminuye conforme aumenta la concentración de esta especie oxidante en el agua de lavado. Estos autores también establecieron un aumento del ORP a bajos rangos de pH, así como un descenso del ORP con el aumento de la DQO o la demanda de cloro. Concluyeron que la influencia de todos estos factores limita la utilización de los valores de ORP para estimar la concentración de cloro libre en el agua de lavado de frutas y hortalizas.

CAPÍTULO V

Optimización y validación de una metodología adecuada para la detección y cuantificación de subproductos de desinfección, ácidos haloacéticos, en producto vegetal fresco cortado y en su agua de lavado

Albolafio, S., Marín, A., Gil, M.I. Validation and verification analyses of haloacetic acids as chlorinated disinfection by-products in the fresh-cut industry by liquid chromatography-tandem multiple reaction monitoring mass spectrometry (UHPLC-MRM). Food Chemistry. En revisión.

1. OBJETIVO

En este estudio se desarrolló, optimizó y validó una metodología para el análisis de 9 ácidos haloacéticos (HAA9) en producto vegetal fresco cortado y en agua de lavado de ese producto, utilizando lechuga iceberg (*Lactuca sativa L*) como modelo. La determinación de estos DBPs se realizó mediante el análisis por cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo con ionización por electrospray en modo negativo (UHPLC-ESI-QqQ). En el caso del producto vegetal, se desarrolló y optimizó un proceso de extracción previo al análisis de los HAAs. La validación de la metodología se realizó siguiendo las recomendaciones de la guía SANTE “Procedimientos para el control de la calidad analítica y la validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos” (SANTE, 2019), donde en primer lugar se optimizaron las condiciones del espectrómetro de masas mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM), para la correcta identificación y cuantificación de los analitos. Posteriormente, la metodología desarrollada se validó atendiendo a criterios de selectividad, especificidad, evaluación de la curva de calibración y linealidad, límites de cuantificación (LoQ) e identificación (LoD), evaluación del efecto matriz, exactitud, estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado y medición de la incertidumbre. Como último paso, se realizó la verificación de la metodología para el análisis de los 9 HAAs en muestras comerciales de lechuga iceberg cortada y en agua de lavado, ambas provenientes de una industria de procesado en IV gama. Estos HAAs consistieron en ácido monocloroacético (MCAA), ácido monobromoacético (MBAA), ácido dicloroacético (DCAA), ácido dibromoacético (DBAA), ácido tricloroacético (TCAA), ácido tribromoacético (TBAA), ácido bromocloroacético (BCAA), ácido clorodibromoacético (CDBAA) y ácido bromodicloroacético (BDCAA).

La metodología de este estudio está incluida en las secciones 6.1. (Análisis físico-químico y microbiológico), 7.2. (Métodos para el análisis del cloro. Método cronoamperométrico) y 10.2 (Análisis de subproductos de desinfección (DBPs). Ácidos haloacéticos (HAAs)).

2. RESULTADOS

2.1. Optimización del análisis mediante UHPLC- MRM

Para cada uno de los HAAs analizados, se optimizaron dos transiciones para la adquisición de datos mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM). La transición (ión precursor > ión producto) más intensa para cada uno de los HAAs se seleccionó como “transición cuantificadora” y la segunda más intensa como “transición cualificadora”. Las transiciones cuantificadoras habían sido previamente descritas (do Lago y Daniel, 2019), por lo que se realizó la optimización de las transiciones cualificadoras para cada uno de los HAAs. La optimización de estos parámetros, así como los iones precursores y producto de las transiciones cualificadora y cuantificadora para cada uno de los HAAs, se describen en la **Tabla 5.1**. Tal y como se puede observar, el ión producto formado para la mayoría de las transiciones cuantificadoras de los HAAs fueron las formas descarboxiladas y del halógeno ionizadas. Asimismo, las transiciones cualificadoras siguieron el mismo patrón que aquellas cuantificadoras, pero sustituyendo uno o varios de los halógenos por su isótopo menos abundante (^{37}Cl y ^{81}Br). Sin embargo, en el caso del BCAA los iones productos para la transición cuantificadora y cualificadora consistieron en la forma descarboxilada y el halógeno ionizado, respectivamente (**Tabla 5.1**). Asimismo, una vez optimizadas las distintas transiciones para cada uno de los HAAs, se comprobó que la diferencia del valor promedio de la “relación de iones” (área del pico de la transición cualificadora/área del pico de la transición cuantificadora) entre

la curva de calibración en solvente (agua ultrapura) y las dos matrices estudiadas (agua de lavado y tejido vegetal) no fuera mayor del mayor del 30%. Los resultados mostraron que, aunque las diferencias fueron cercanas al 30% en el caso de DCAA y DBAA para la matriz de agua de lavado, de forma general y para todos los HAAs la media de la relación de iones para los distintos niveles de calibración en los extractos de las matrices estudiadas estuvo dentro del $\pm 30\%$ de la media de los mismos estándares de calibración en solvente, cumpliendo el criterio establecido por la guía SANTE.

Tabla 5.1. Parámetros para la adquisición de datos mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) y los 5 patrones internos marcados isotópicamente (ILIS), incluyendo los iones precursor y producto y el cálculo de la “relación de iones” en solvente (agua ultrapura), agua de lavado y lechuga.

Compuesto	Ión precursor ^a		Ión producto ^a		Fragmentor (V)	Energía de colisión (V)	Relación de iones ^b solvente	Relación de iones ^b agua de lavado	Relación de iones ^b lechuga
	m/z	Transición	m/z	Transición					
MCAA	93	C ₂ H ₂ [³⁵ Cl]O ₂ ⁻	35	[³⁵ Cl] ⁻	60	5	0.35	0.35	0.36
	95	C ₂ H ₂ [³⁷ Cl]O ₂ ⁻	37	[³⁷ Cl] ⁻	60	5			
MCAA- ¹³ C	94.1	[¹³ C]CH ₂ [³⁵ Cl]O ₂ ⁻	35.1	[³⁵ Cl] ⁻	60	5			
MBAA	137	C ₂ H ₂ [⁷⁹ Br]O ₂ ⁻	79	[⁷⁹ Br] ⁻	60	5	0.96	0.91	0.95
	139	C ₂ H ₂ [⁸¹ Br]O ₂ ⁻	81	[⁸¹ Br] ⁻	60	5			
MBAA- ¹³ C	138	[¹³ C]CH ₂ [⁷⁹ Br]O ₂ ⁻	79	[⁷⁹ Br] ⁻	60	5			
DCAA	127	C ₂ H[³⁵ Cl] ₂ O ₂ ⁻	83	CH[³⁵ Cl] ₂	60	3	0.63	0.47	0.66
	129	C ₂ H[³⁷ Cl] ₂ O ₂ ⁻	85	CH[³⁷ Cl] ₂	60	3			
DCAA- ¹³ C	128	[¹³ C]CH[³⁵ Cl] ₂ O ₂ ⁻	84.1	CH[³⁵ Cl] ₂	60	3			
DBAA	217	C ₂ H[⁷⁹ Br] ₂ O ₂ ⁻	173	CH[⁷⁹ Br] ₂	60	7	0.50	0.36	0.50
	219	C ₂ H[⁸¹ Br] ₂ O ₂ ⁻	175	CH[⁸¹ Br] ₂	60	7			
DBAA- ¹³ C	218	[¹³ C]CH[⁷⁹ Br] ₂ O ₂ ⁻	173	¹³ CH[⁷⁹ Br] ₂	60	7			

TCAA	161	$C_2[^{35}Cl]_3O_2^-$	117	$C[^{35}Cl]_3$	40	1	1.00	0.98	0.96
	163	$C_2[^{37}Cl]_3O_2^-$	119	$C[^{37}Cl]_3$	40	1			
TCAA-¹³C	162	$[^{13}C]C[^{35}Cl]_3O_2^-$	118	$^{13}C[^{35}Cl]_3$	40	1			
TBAA	251	$C[^{79}Br]_3^-$	79	$[^{79}Br]^-$	55	14	1.08	1.15	1.01
	253	$C[^{81}Br]_3^-$	81	$[^{81}Br]^-$	55	14			
BCAA	173	$C_2H[^{79}Br][^{35}Cl]O_2^-$	129	$CH[^{79}Br][^{35}Cl]^-$	80	7	0.22	0.17	0.22
	173	$C_2H[^{79}Br][^{35}Cl]O_2^-$	79	$[^{79}Br]^-$	80	7			
CDBAA	207	$C[^{79}Br]_2[^{35}Cl]^-$	79	$[^{79}Br]^-$	80	3	1.08	1.03	1.01
	209	$C[^{81}Br]_2[^{35}Cl]^-$	81	$[^{81}Br]^-$	80	3			
BDCAA	163	$C[^{81}Br][^{35}Cl]_2^-$	81	$[^{81}Br]^-$	65	5	0.81	0.73	0.66
	165	$C[^{81}Br][^{37}Cl][^{35}Cl]^-$	81	$[^{81}Br]^-$	65	5			

^a Para cada uno de los HAAs, el ión precursor y el ión producto en la primera fila se utiliza como transición cuantificadora y en la segunda fila se utiliza como transición cualificadora. ^b área del pico de la transición cualificadora/área del pico de la transición cuantificadora, calculado como un valor promedio en cinco niveles de calibración. Relación masa /carga (m/z). Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2. Validación de la metodología

2.2.1. Selectividad y especificidad

La metodología utilizada para el análisis de los HAAs (UHPLC-MRM) se considera altamente selectiva y específica, ya que utiliza las transiciones optimizadas en la sección anterior (transiciones cuantificadoras y cualificadoras) para identificar inequívocamente los 9 HAAs presentes en las muestras, así como para discriminar entre estos compuestos y otros posibles analitos que pudieran estar presentes en las matrices estudiadas. En la **Figura 5.1** se muestran los cromatogramas para los 9 HAAs fortificados en solvente y en las matrices blancas de agua de lavado y de lechuga. Además de esto, también se confirmó la ausencia de respuesta para cada uno de los HAAs en todas las matrices estudiadas. Únicamente se detectó la presencia de trazas de algunos HAAs en el agua de lavado, donde se restó la señal del blanco de la curva de calibración, en los casos en los que fue estrictamente necesario. Asimismo, siguiendo los criterios de la guía SANTE, se comprobó que el tiempo de retención de los HAAs en solvente (agua ultrapura) y en las dos matrices estudiadas no presentaba una diferencia mayor a ± 0.1 min (**Figura 5.1**).

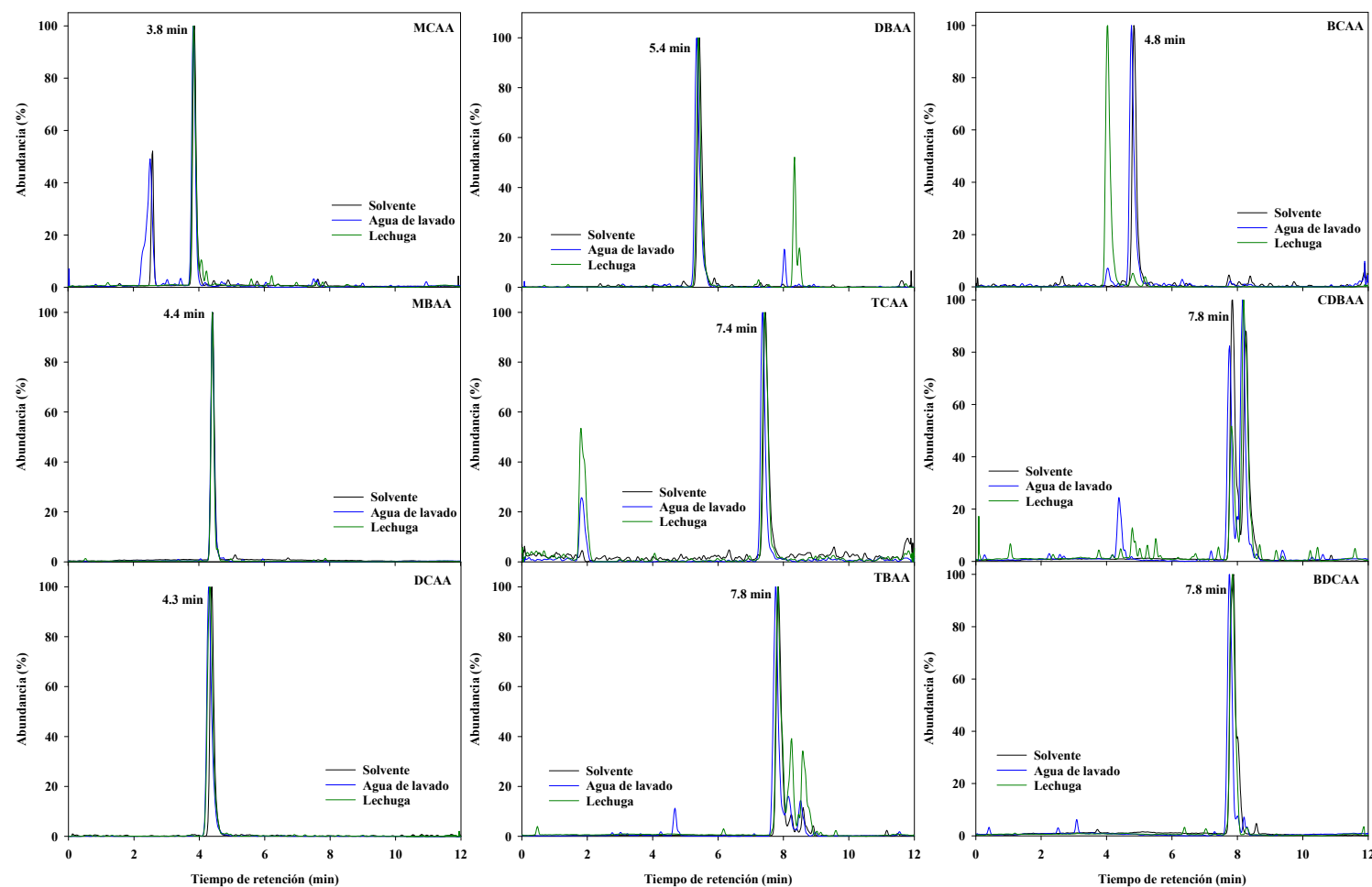


Figura 5.1. Cromatogramas para los 9 ácidos haloacéticos fortificados a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en solvente (agua ultrapura) (---) y en matriz de agua de lavado (---) y a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ en matriz de lechuga (---). Las intensidades representadas fueron las normalizadas a razón del pico más intenso, para cada transición en las distintas matrices. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2.2. Curvas de calibración y linealidad

Una vez preparadas y analizadas las curvas de calibración para solvente y las dos matrices estudiadas, el conjunto de datos obtenido en cuanto a la relación (área del pico patrón HAA/área del pico ILIS) fueron estadísticamente analizados en cuanto a la independencia de las observaciones, la evaluación de la normalidad y la homogeneidad de las varianzas. El test de Levene reveló que las varianzas fueron heterocedásticas ($p < 0.05$) (datos no mostrados) en las curvas de calibración para todo el rango de concentraciones seleccionado. La técnica de ajuste para la regresión lineal con varianzas no homogéneas consistió en utilizar una calibración basada en mínimos cuadrados ponderados (WLS), considerando el valor de la varianza en cada punto de calibración, como solución alternativa a los mínimos cuadrados ordinarios (OLS). El factor de ponderación aplicado fue $1/x^2$, donde x correspondía a la concentración de los diferentes niveles de calibración. En la **Tabla 5.2** se muestran las ecuaciones de las curvas de calibración para cada uno de los HAAs en las distintas matrices estudiadas, así como el coeficiente de determinación (R^2). Tal y como se ha comentado anteriormente, la linealidad se evaluó comparando, para cada punto de calibración, el valor de concentración obtenido experimentalmente (X_{exp}) con el valor teórico (X_{theo}) y expresado como porcentaje de error relativo (%ER), donde este porcentaje no debe ser mayor al 20% (SANTE, 2019). Los resultados para el promedio del porcentaje de error relativo de toda la curva de calibración (%ER_{AVER}), así como el máximo porcentaje de error relativo teniendo en cuenta todos los niveles de calibración (%ER_{MAX}), y para cada uno de los HAAs, se muestran en la **Tabla 5.2**. Únicamente se observó un valor con un %ER_{MAX} ligeramente superior al 20% en el caso del BCAA en la matriz de lechuga, lo que demostró el cumplimiento del principio de linealidad para todos los HAAs en las distintas matrices estudiadas (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2. Ecuaciones para las curvas de calibración basadas en la regresión de mínimos cuadrados ponderados (WLS), coeficiente de determinación (R^2), porcentaje máximo de error relativo ($\%ER_{MAX}$) teniendo en cuenta todos los niveles de la curva de calibración, promedio del porcentaje de error relativo ($\%ER_{AVER}$) de toda la curva de calibración, límite de cuantificación (LoQ) y límite de detección (LoD), para los 9 ácidos haloacéticos en solvente (agua ultrapura), agua de lavado y lechuga.

SOLVENTE						
Compuesto	Curva de calibración (factor de ponderación: $1/x^2$)	R^2	$\%RE_{MAX}$	$\%RE_{AVER}$	LoQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LoD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
MCAA	$y = 0.009138x + 0.012730$	0.9936	12.3	6.5	3.0	1.0
MBAA	$y = 0.008882x + 0.011461$	0.9646	12.1	6.3	2.0	0.7
DCAA	$y = 0.010228x - 0.010213$	0.9972	5.5	3.6	1.0	0.3
DBAA	$y = 0.009218x + 0.017175$	0.9941	8.8	5.9	5.0	1.7
TCAA	$y = 0.009428x + 0.008493$	0.9963	9.9	7.8	2.0	0.7
TBAA	$y = 0.006926x - 0.000424$	0.9970	10.1	5.6	1.0	0.3
BCAA	$y = 0.011074x + 0.000091$	0.9933	6.4	4.2	1.0	0.3
CDBAA	$y = 0.004526x + 0.001134$	0.9835	19.9	9.9	2.0	0.7
BDCAA	$y = 0.001455x + 0.000325$	0.9951	15.1	5.8	2.0	0.7

AGUA DE LAVADO								
Compuesto	Curva de calibración (factor de ponderación: $1/x^2$)	R^2	%RE _{MAX}	%RE _{AVER}	LoQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		LoD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
					M	S	M	S
MCAA	$y = 0.009446x + 0.015473$	0.9708	15.2	8.0	3.0	4.0	1.0	1.3
MBAA	$y = 0.009554x + 0.019461$	0.9385	16.7	9.4	4.0	4.0	1.3	1.3
DCAA	$y = 0.009854x + 0.001563$	0.9935	5.8	3.9	3.0	3.0	1.0	1.0
DBAA	$y = 0.009355x + 0.006636$	0.9892	20.4	6.4	5.0	5.0	1.7	1.7
TCAA	$y = 0.009469x - 0.002014$	0.9900	7.6	6.8	3.0	3.0	1.0	1.0
TBAA	$y = 0.006740x - 0.001647$	0.9967	7.3	4.3	3.0	2.0	1.0	0.7
BCAA	$y = 0.007773x - 0.004531$	0.9886	5.6	6.6	3.0	-	1.0	-
CDBAA	$y = 0.003950x + 0.000066$	0.9947	13.7	5.7	3.0	3.0	1.0	1.0
BDCAA	$y = 0.001337x - 0.000017$	0.9718	10.0	11.6	4.0	5.0	1.3	1.7

LECHUGA									
Compuesto	Curva de calibración (factor de ponderación: $1/x^2$)	R^2	%RE _{MAX}	%RE _{AVER}	LoQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		LoD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
					M	S	M	S	
MCAA	$y = 0.009813x + 0.015560$	0.9797	12.1	5.9	3.0	3.0	1.0	1.0	
MBAA	$y = 0.009459 + 0.008340$	0.9903	17.9	8.7	3.0	3.0	1.0	1.0	
DCAA	$y = 0.009345x + 0.015689$	0.9977	7.1	3.3	3.0	5.0	1.0	1.7	
DBAA	$y = 0.010059x + 0.014515$	0.9940	10.2	6.0	5.0	5.0	1.7	1.7	
TCAA	$y = 0.009361x + 0.006125$	0.9980	7.9	4.7	3.0	3.0	1.0	1.0	
TBAA	$y = 0.002168x + 0.001061$	0.9978	9.5	4.4	3.0	-	1.0	-	
BCAA	$y = 0.002506x - 0.002020$	0.9766	22.3	15.1	2.0	-	0.7	-	
CDBAA	$y = 0.001821x + 0.000419$	0.9965	12.6	6.1	3.0	-	1.0	-	
BDCAA	$y = 0.001459x - 0.000156$	0.9966	12.1	5.9	4.0	4.0	1.3	1.3	

Para cada una de las curvas de calibración, los valores corresponden al promedio de tres réplicas por trece niveles de calibración. El rango de calibración para cada HAA fue de LoQ-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, para solvente y agua de lavado y de LoQ-1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para lechuga. Para la verificación de los LoQ y LoD se analizaron 5 réplicas por cada nivel de calibración. M: LoQ y LoD calculados utilizando curvas de calibración en matriz. S: LoQ y LoD calculados utilizando las curvas de calibración en solvente. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2.3. Límite de cuantificación (LoQ) y límite de detección (LoD)

Los límites de cuantificación (LoQ) y de detección (LoD) instrumentales son los primeros que se determinaron y confirmaron, representando los niveles más bajos para todos los HAAs (**Tabla 5.2**). Posteriormente, estos límites fueron calculados para las dos matrices estudiadas (agua de lavado y lechuga), y utilizando para ello tanto curvas de calibración en solvente (agua ultrapura) como curvas de calibración en matriz. Tal y como era de esperar, los límites más bajos se observaron cuando se utilizó la curva de calibración en matriz. Asimismo, como se puede comprobar en los resultados, los LoD se situaron en el rango de 0.3-1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$, y los LoQ variaron entre 2-5 $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$, para todos los HAAs, independientemente de la matriz estudiada (**Tabla 5.2**). Sin embargo, resulta necesario indicar que, para la verificación de los LoD y LoQ en aquellos HAAs cuyo análisis se vio afectado por la matriz, únicamente se utilizaron curvas de calibración en matriz, siendo ésta la única calibración válida para la verificación de los límites en estos casos. Éste fue el caso del BCAA en la matriz de agua de lavado y del TBAA, BCAA y CDBAA en la matriz de lechuga (**Tabla 5.2**). Por último, cabe mencionar que el DBAA fue el HAA con mayores LoD (1.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$) y LoQ (5 $\mu\text{g L}^{-1}$ o $\mu\text{g kg}^{-1}$), no revelando diferencias en estos límites dependiendo de la matriz estudiada (**Tabla 5.2**).

2.2.4. Evaluación del efecto matriz

El efecto matriz se evaluó en agua de lavado con dos niveles de demanda química de oxígeno (DQO) (400 y 800 mg L^{-1}), así como en lechuga. Para ello, se comparó la respuesta de los HAAs en agua ultrapura (solvente) con la respuesta de los HAAs fortificados en las matrices indicadas. Los resultados de la evaluación del efecto matriz

en las matrices fortificadas con la mezcla de HAAs a tres niveles de concentración se muestran en la **Figura 5.2**. La guía SANTE establece que, en el caso de que el aumento o la disminución de la respuesta de cada uno de los analitos en las matrices estudiadas en comparación con la respuesta en solvente sea superior al 20%, el efecto matriz debe ser considerado en la curva de calibración (SANTE, 2019). Por tanto, el efecto matriz calculado debería estar entre 80-120%.

Los resultados para el efecto matriz fueron muy similares en las dos matrices de agua de lavado con 400 mg L⁻¹ de DQO (**Figura 5.2 A**) y agua de lavado con 800 mg L⁻¹ de DQO (**Figura 5.2 B**). En ambas matrices, el BCAA fue el único HAA que mostró más de un 20% de supresión para los tres niveles evaluados, mostrando un efecto matriz en el rango de 59-71%, en agua de lavado con 400 mg L⁻¹ de DQO (**Figura 5.2 A**), y de 53-72% en agua de lavado con 800 mg L⁻¹ de DQO (**Figura 5.2 B**). En cambio, el resto de HAAs mostraron un efecto matriz dentro del rango de 80-120%, aproximadamente (SANTE, 2019). Asimismo, aunque el BCAA fue el único HAA que presentó efecto matriz en las aguas de lavado estudiadas, algunos de los HAAs mostraron una ligera supresión de la respuesta a las concentraciones más bajas fortificadas:

- DBAA, TCAA y CDBAA, con un 65%, 73% y 78% de efecto matriz, respectivamente, en agua de lavado con 400 mg L⁻¹ de DQO, en el caso del nivel de fortificación de 5 µg L⁻¹ (**Figura 5.2 A**).
- CDBAA, con un efecto matriz del 79%, para agua con 400 mg L⁻¹ de DQO y a un nivel de fortificación de 20 µg L⁻¹ (**Figura 5.2 A**).
- DBAA y TCAA, revelando un efecto matriz del 71% y 79%, respectivamente, para agua de lavado con 800 mg L⁻¹ de DQO, y un nivel de fortificación de 5 µg L⁻¹ (**Figura 5.2 B**).

En cuanto a la matriz de lechuga, la evaluación del efecto matriz mostró supresión para tres HAAs en los tres niveles de concentración fortificados (**Figura 5.2 C**). En concreto, el efecto matriz se situó en el rango de 36-47% para TBAA, 40-46% para BCAA y 53-62% para CDBAA.

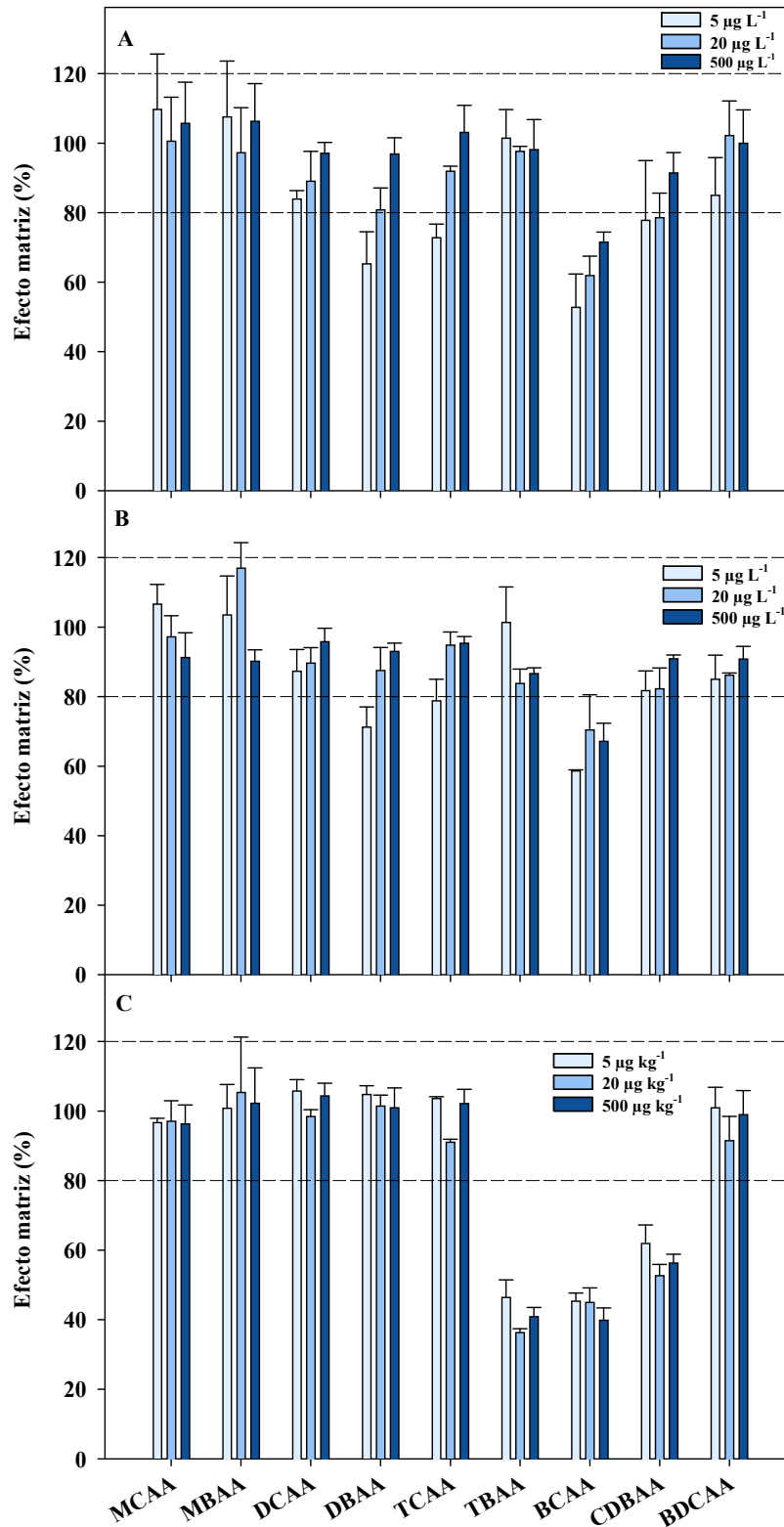


Figura 5.2. Efecto matriz (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en (A) agua de lavado con 400 mg L⁻¹ de DQO, (B) agua de lavado con 800 mg L⁻¹ de DQO y (C) lechuga. Las matrices fueron fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y 500 µg L⁻¹, para agua de lavado o 5, 20 y 500 µg kg⁻¹, para lechuga. Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de tres réplicas. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

Asimismo, el efecto matriz también se calculó a lo largo de todo el rango de concentraciones incluidas en la curva de calibración, comparando las pendientes de las curvas de calibración en la matriz y en el solvente. Este cálculo confirmó los resultados mostrados anteriormente (**Tabla 5.3**). En el caso de las aguas de lavado estudiadas a dos concentraciones de materia orgánica (DQO 400 y 800 mg L⁻¹) el análisis del BCAA mostró más del 20% de supresión. Asimismo, el efecto matriz para la lechuga mostró más de un 20% de supresión para TBAA, BCAA y CDBAA. El resto de los HAAs mostraron porcentajes dentro del 80-120%, en todas las matrices. Por último, se realizó la prueba t de Student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las curvas de calibración en matriz y en solvente (**Tabla 5.3**). Los resultados mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en el caso del BCAA, para todas las matrices, y en el caso del TBAA y CDBAA en la matriz de lechuga (**Tabla 5.3**). Asimismo, aunque también se observaron diferencias significativas para otros de los HAAs estudiados, éstas no fueron cuantitativamente relevantes, ya que no se confirmaron con los % de efecto matriz calculados y el criterio establecido por la guía SANTE (SANTE, 2019).

Tabla 5.3. Efecto matriz (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs), comparando las pendientes de las curvas de calibración en solvente (agua ultrapura), en agua de lavado con una demanda química de oxígeno (DQO) de 400 y de 800 mg L⁻¹ y en lechuga.

EFECTO MATRIZ (%)			
Compuesto	Agua de lavado DQO 400 mg L ⁻¹	Agua de lavado DQO 800 mg L ⁻¹	Lechuga
MCAA	103±2 *	97±3	94±2
MBAA	108±5	96±3	94±3 *
DCAA	96±1	100±0	95±4 *
DBAA	102±5	99±10	98±2
TCAA	100±1	96±1 *	96±4
TBAA	97±5	88±2 **	38±2 ***
BCAA	70±6 **	67±3 ***	42±3 ***
CDBAA	87±4 *	91±4	53±2 ***
BDCAA	92±3	95±1 *	93±5 *

Los valores se determinaron utilizando tres curvas de calibración por cada matriz. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la pendiente de las curvas de calibración en el solvente (agua ultrapura) y en la matriz. El análisis estadístico, de acuerdo con la prueba t de Student, se expresa como * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001). Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

Asimismo, como estrategia para compensar el efecto matriz en los HAAs indicados (BCAA, en las matrices de agua de lavado y lechuga y TBAA y CDBAA, en la matriz de lechuga), se utilizaron curvas de calibración en matriz, excepto en aquellos casos donde una matriz libre de los compuestos a determinar no estuvo disponible, utilizando en estos casos una curva de calibración en matriz con adición estándar. En este sentido, los % de recuperación relativa mostrados en el siguiente apartado, y utilizando para ello curvas de calibración en matriz revelaron excelentes resultados, poniendo en evidencia que la utilización de curvas de calibración en matriz fue una estrategia adecuada para compensar el efecto matriz de los HAAs indicados.

2.2.5. Veracidad

La veracidad de la metodología se evaluó mediante la evaluación del % de recuperación. Para ello, se evaluaron dos tipos de recuperaciones: la recuperación relativa y la recuperación absoluta. Tal y como se ha comentado anteriormente, para la matriz de lechuga se realizó un procedimiento de extracción previo al análisis de los HAAs mediante UHPLC-QqQ. Por este motivo, para esta matriz se calculó tanto el % de recuperación absoluta, que evalúa el rendimiento de la etapa de extracción del procedimiento analítico, como el % de recuperación relativa, que evalúa la relación entre el valor experimental obtenido a través del procedimiento analítico en comparación con el valor teórico de referencia. Sin embargo, en el caso del agua de lavado, no se aplicó ningún procedimiento de extracción previo al análisis de los HAAs, por lo que los % de recuperación absoluta y relativa serían coincidentes. En primer lugar, los resultados de recuperación absoluta (%), para la matriz de lechuga, se muestran en la **Figura 5.3**. La guía SANTE establece que el % de recuperación debería estar en el rango de 80-120% (SANTE, 2019). Todos los HAAs mostraron un % de recuperación en el rango de 88-107% para los tres niveles de concentración evaluados, cumpliendo adecuadamente el criterio establecido por la guía SANTE (**Figura 5.3**).

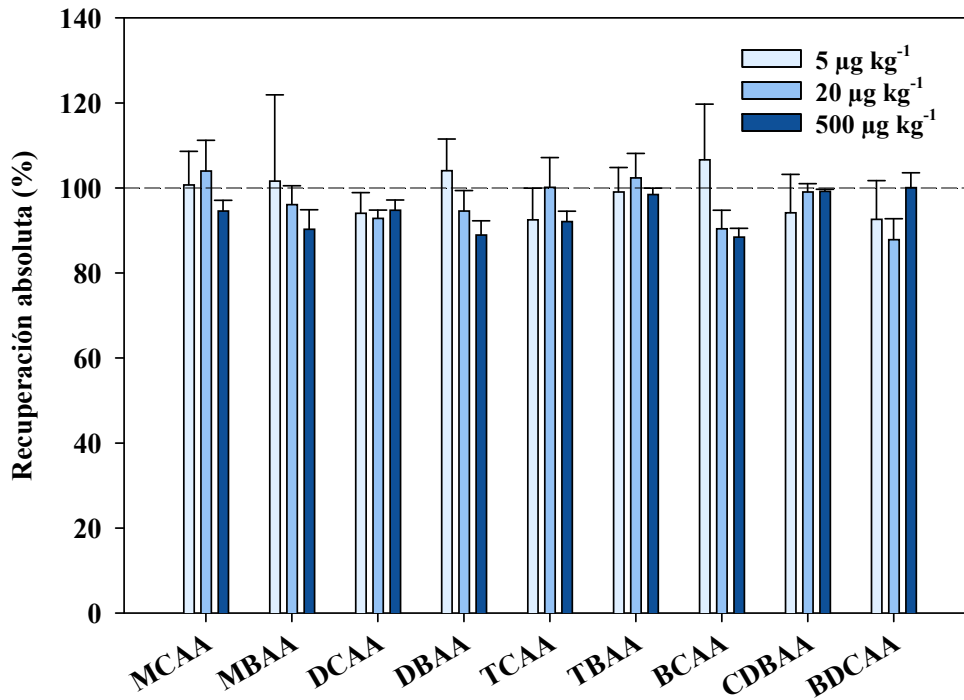


Figura 5.3. Veracidad como % de recuperación absoluta para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en lechuga fortificada con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y 500 µg kg⁻¹. Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de tres réplicas. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

Asimismo, en el caso de la matriz de lechuga, la evaluación de la veracidad también incluyó el cálculo del % de recuperación relativa. Para cada uno de los HAAs en los tres niveles de concentración evaluados, se muestran los resultados de la concentración de HAAs recuperada, así como del % de recuperación relativa (**Tabla 5.4**). En este caso, los % de recuperación relativa variaron entre un 80 y 116%, cumpliendo para todos los HAAs el criterio establecido por la guía SANTE (SANTE, 2019) (**Tabla 5.4**). Igualmente, en el caso de la matriz de agua de lavado, el % de recuperación se situó en el rango del 86-115%, para todos los HAAs, cumpliendo también el criterio establecido por la guía SANTE (**Tabla 5.4**)

Tabla 5.4. Veracidad como % de recuperación, para la matriz de agua de lavado, y como % de recuperación relativa, para la matriz de lechuga, concentración recuperada, precisión como repetibilidad (RSD_r) y precisión intermedia (RSD_{wr}), para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en las matrices fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y 500 µg L⁻¹, para agua de lavado, y 5, 20 y 500 µg kg⁻¹, para lechuga.

AGUA DE LAVADO						LECHUGA					
Compuesto	Nivel de fortificación (µg L ⁻¹)	Concentración recuperada (µg L ⁻¹)	Recuperación (%)	RSD _r (%)	RSD _{wr} (%)	Compuesto	Nivel de fortificación (µg kg ⁻¹)	Concentración recuperada (µg kg ⁻¹)	Recuperación relativa (%)	RSD _r (%)	RSD _{wr} (%)
MCAA	5	5.1 ± 0.9	101 ± 19	16	20	MCAA	5	5.0 ± 0.5	100 ± 10	8	11
	20	22.8 ± 2.6	114 ± 13	14	13		20	20.6 ± 1.8	103 ± 9	8	7
	500	485.6 ± 27.4	97 ± 5	5	6		500	491.5 ± 11.5	98 ± 2	2	2
MBAA	5	4.7 ± 0.3	94 ± 7	18	22	MBAA	5	4.8 ± 0.2	97 ± 5	11	8
	20	19.6 ± 2.8	98 ± 14	17	17		20	19.5 ± 0.8	98 ± 4	2	3
	500	429.1 ± 17.7	86 ± 4	11	8		500	444.9 ± 4.7	89 ± 1	3	3
DCAA	5	5.1 ± 0.6	102 ± 13	2	6	DCAA	5	4.6 ± 0.2	92 ± 3	2	3
	20	20.1 ± 1.3	101 ± 6	3	5		20	19.6 ± 1.8	98 ± 9	3	6
	500	455.9 ± 26.1	91 ± 5	3	4		500	473.8 ± 2.2	95 ± 0	5	3
DBAA	5	5.1 ± 0.3	102 ± 7	7	5	DBAA	5	5.2 ± 0.3	105 ± 6	6	7
	20	20.2 ± 1.4	101 ± 7	5	5		20	19.6 ± 0.6	98 ± 3	2	3
	500	467.0 ± 14.2	93 ± 3	2	4		500	451.9 ± 3.4	90 ± 1	1	2
TCAA	5	5.3 ± 0.5	105 ± 9	7	9	TCAA	5	4.9 ± 0.2	99 ± 5	7	6
	20	20.3 ± 0.9	101 ± 4	5	6		20	19.5 ± 0.9	97 ± 4	5	4
	500	482.3 ± 15.2	96 ± 3	1	3		500	474.4 ± 5.7	95 ± 1	1	2

TBAA	5	4.9 ± 0.3	98 ± 5	5	6	TBAA	5	5.7 ± 0.5	114 ± 10	15	11
	20	20.0 ± 6.2	100 ± 4	3	3		20	18.9 ± 1.1	94 ± 6	3	11
	500	518.7 ± 7.9	104 ± 4	2	5		500	436.3 ± 11.2	87 ± 2	5	5
BCAA	5	5.8 ± 0.6	115 ± 112	4	10	BCAA	5	5.5 ± 0.6	110 ± 12	10	12
	20	19.1 ± 1.0	96 ± 5	6	6		20	17.9 ± 1.7	90 ± 8	4	6
	500	467.8 ± 9.6	94 ± 2	5	5		500	401.1 ± 9.1	80 ± 2	6	5
CDBAA	5	5.0 ± 0.2	101 ± 5	7	6	CDBAA	5	5.8 ± 0.4	116 ± 8	12	12
	20	19.8 ± 1.1	99 ± 6	6	6		20	18.1 ± 0.7	90 ± 4	6	7
	500	483.6 ± 17.6	97 ± 4	2	4		500	473.4 ± 8.8	95 ± 2	3	3
BDCAA	5	5.6 ± 0.3	112 ± 5	11	9	BDCAA	5	5.0 ± 0.8	100 ± 15	7	11
	20	19.8 ± 1.6	99 ± 8	2	5		20	18.6 ± 1.0	93 ± 5	7	5
	500	504.9 ± 14.7	101 ± 3	4	5		500	473.4 ± 5.5	95 ± 1	3	3

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de cinco réplicas para la veracidad, la desviación estándar relativa (RSD) de cinco réplicas para la repetibilidad (RSD_r) y la RSD de quince réplicas para la precisión intermedia (RSD_{wr}). Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2.6. Precisión

La precisión se calculó como repetibilidad (RSD_r) y como precisión intermedia (RSD_{WR}), estableciendo el nivel máximo de 20% para este parámetro (SANTE, 2019). Los resultados revelaron que la metodología validada mostró buenos niveles de precisión para todos los HAAs en las dos matrices estudiadas (**Tabla 5.4**). Únicamente para el agua de lavado con el menor nivel de concentración fortificada, se mostraron valores de RSD_{WR} del 20% o ligeramente superiores para MCAA y MBAA, respectivamente (**Tabla 5.4**). Asimismo, es necesario destacar que, para todos los HAA, los mayores valores de RSD se observaron para las concentraciones más bajas y cercanas al LoQ, en las dos matrices estudiadas.

2.2.7. Estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado

La estabilidad de los HAAs en las matrices estudiadas se evaluó como la RSD de la concentración de HAAs calculada a lo largo de todo el período de almacenamiento. Concretamente, para el cálculo de la estabilidad a 4 °C, las muestras se analizaron los días 1, 2 y 3, y para el cálculo de la estabilidad a -20°C, las muestras se descongelaron y analizaron los días 1, 7 y 21. Los resultados mostraron que todos los HAAs fueron estables tras 3 días de almacenamiento a 4°C, mostrando valores de RSD cercanos al 20%, en todos los casos. Únicamente se observó un valor ligeramente superior en el caso del MBAA para la concentración más baja fortificada en el agua de lavado (RSD 24%) (**Tabla 5.5**). Asimismo, los resultados también demostraron la estabilidad de todos los HAAs tras su almacenamiento a -20 °C durante 21 días, excepto para el MBAA en el caso del agua de lavado, donde la concentración analizada se situó por debajo del LoQ tras 7 días de almacenamiento, o incluso antes (**Tabla 5.5**). Estos resultados pusieron en

evidencia que la congelación del agua de lavado conllevó la degradación del MBAA, concluyendo que estas muestras no se aconseja que sean congeladas antes de su análisis, mientras que pueden ser conservadas en refrigeración incluso 3 días sin observarse la degradación o pérdida de los 9 HAAs analizados.

Tabla 5.5. Estabilidad de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en agua de lavado y en lechuga fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs a 5, 20 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para agua de lavado y de 5, 20 y 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para lechuga. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y -20 °C durante 3 y 21 días, respectivamente antes de su análisis.

AGUA DE LAVADO				LECHUGA			
Compuesto	Nivel de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD 3 días 4 °C	RSD 21 días -20 °C	Compuesto	Nivel de fortificación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD 3 días 4 °C	RSD 21 días -20 °C
MCAA	5	20	16	MCAA	5	12	20
	20	13	7		20	10	8
	500	6	7		500	8	11
MBAA	5	24	*	MBAA	5	15	13
	20	16	*		20	3	8
	500	9	*		500	4	4
DCAA	5	9	10	DCAA	5	4	9
	20	4	8		20	3	6
	500	3	7		500	3	5
DBAA	5	19	11	DBAA	5	11	8
	20	7	10		20	4	7
	500	2	10		500	2	6
TCAA	5	17	15	TCAA	5	9	12
	20	4	8		20	3	6
	500	2	6		500	2	6
TBAA	5	17	17	TBAA	5	10	7
	20	7	15		20	9	6
	500	5	11		500	8	4
BCAA	5	12	14	BCAA	5	17	10
	20	7	8		20	8	8
	500	5	13		500	3	8
CDBAA	5	15	16	CDBAA	5	13	13
	20	8	12		20	5	8
	500	4	9		500	4	3
BDCAA	5	12	13	BDCAA	5	16	10
	20	7	9		20	9	6
	500	3	5		500	5	5

Los valores corresponden a la desviación estándar relativa (RSD) de la concentración de HAAs de quince réplicas analizadas durante 3 días de almacenamiento a 4 °C y de la RSD de quince réplicas analizadas durante 21 días de almacenamiento a -20 °C. *<LoQ. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2.8. Incertidumbre

La medición de la incertidumbre se realizó mediante una aproximación simplificada, utilizando los datos derivados del proceso de validación. Asimismo, se estableció el límite máximo del 50% para la medición de la incertidumbre expandida (MU expandida), el cual no se superó en la mayoría de los casos (SANTE, 2019) (**Figura 5.4**). Sin embargo, estos valores fueron ligeramente superiores en las concentraciones cercanas al LoQ. Concretamente, en la matriz de agua de lavado al nivel de fortificación inferior ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), la MU expandida superó ligeramente el límite máximo para MCAA, DBAA y BCAA, mostrando valores del 55% en todos los casos (**Figura 5.4**). En cambio, la MU expandida disminuyó a medida que aumentó la concentración fortificada de HAAs, con un único valor por encima del límite máximo establecido, en el caso del MBAA fortificado a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (MU expandida del 52%) (**Figura 5.4**). En el caso de la matriz de lechuga se observó una tendencia similar, con un único valor ligeramente superior al límite establecido (MU expandida del 51%, en el caso del BCAA a la concentración fortificada más baja) (**Figura 5.4**). Estos resultados de la incertidumbre mostraron que la metodología desarrollada y validada fue adecuada para la determinación de los 9 HAAs en lechuga y en agua de lavado, revelando en todos los casos valores por debajo del 55%.

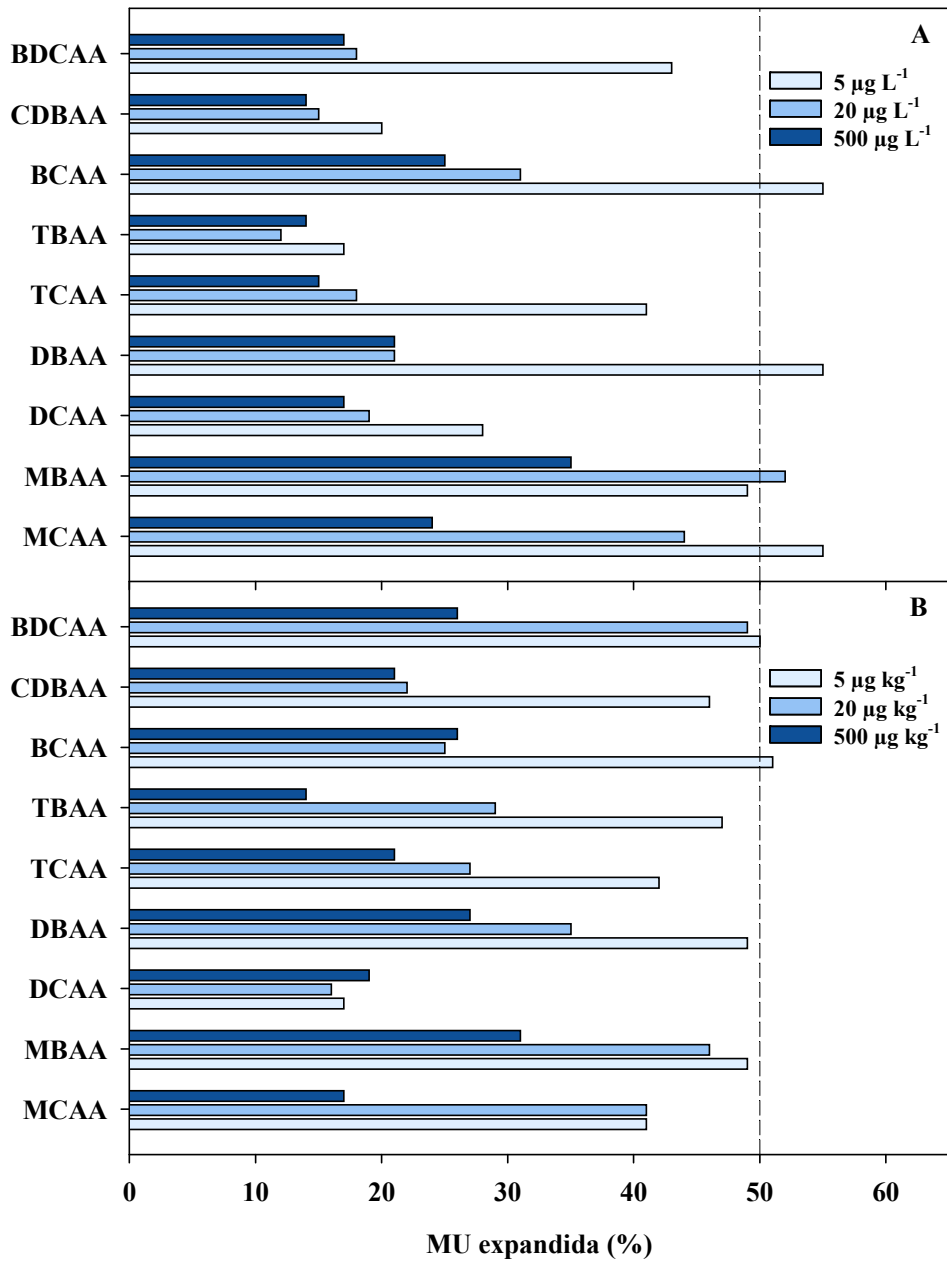


Figura 5.4. Medición de la incertidumbre (MU) expandida (%) para cada uno de los 9 ácidos haloacéticos (HAAs) en (A) agua de lavado y (B) en lechuga, fortificadas con una mezcla patrón de los 9 HAAs de 5, 20 y 500 µg L⁻¹ para agua de lavado y de 5, 20 y 500 µg kg⁻¹ para lechuga. Los datos corresponden a quince réplicas para cada uno de los HAAs por nivel de fortificación. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

2.2.9. Verificación de la metodología en muestras comerciales

La eficacia y utilidad de la metodología validada se verificó mediante el análisis de los 9 HAAs en muestras comerciales de lechuga iceberg cortada y en el agua de lavado de la misma muestreadas de una industria de IV gama. Los resultados revelaron la presencia de los 9 HAAs en el agua de lavado procedente del tanque de prelavado (WT1) y del tanque de lavado (WT2), aunque con diferencias en cuanto a la concentración de estos DBPs (**Tabla 5.6**). A excepción del DBAA, que reveló una concentración relativamente constante en los dos tanques (9.1-9.6 $\mu\text{g L}^{-1}$), el contenido de HAAs fue un 61-92% mayor en el WT1 que en el WT2 (**Tabla 5.6**). Estos resultados pusieron en evidencia las altas concentraciones de HAAs presentes en los dos tanques de lavado muestreados, superando ampliamente (WT1, HAA5=603.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y WT2, HAA5=80.1 $\mu\text{g L}^{-1}$) el límite máximo residual de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para HAA5 en agua potable, establecido por la UE y la USEPA (USEPA, 1998, 2006; UE, 2020a). En cuanto a la lechuga, de los 9 HAAs analizados, únicamente se detectaron dos de ellos (DCAA y TCAA) (**Tabla 5.6**). Sin embargo, tal y como se puede observar, aunque la suma de estos dos HAAs no alcanzó el límite máximo residual de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ establecido para agua potable, las concentraciones de estos HAAs fueron relativamente elevadas e incluso cercanas a este límite en algunas de las muestras analizadas (L1, HAA5=51.8 $\mu\text{g L}^{-1}$). En definitiva, estos resultados pusieron en evidencia la eficacia de la metodología validada para la correcta monitorización de los 9 HAAs en la industria de procesado en IV gama.

Tabla 5.6. Concentración de ácidos haloacéticos (HAAs) individuales y totales (HAA9) en agua de lavado y en lechuga fresca cortada proveniente de una industria de IV gama.

AGUA DE LAVADO										
Muestra	Concentración de HAAs ($\mu\text{g L}^{-1}$)									
	MCAA	MBAA	DCAA	DBAA	TCAA	TBAA	BCAA	CDBAA	BDCAA	HAA9
WT1	61.7±8.3	15.5±2.3	265.1±50.5	9.1±1.3	251.6±13.2	18.0±2.0	9.1±2.9	16.0±1.5	28.4±1.8	674.6±66.1
WT2	13.9±3.2	6.0±0.3	20.8±0.8	9.6±0.9	29.8±0.9	4.9±0.8	4.3±0.6	5.2±0.7	6.4±1.4	100.8±4.9
LECHUGA										
Muestra	Concentración de HAAs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)									
	MCAA	MBAA	DCAA	DBAA	TCAA	TBAA	BCAA	CDBAA	BDCAA	HAA9
L1	*	*	15.1±1.0	*	36.7±2.3	*	*	*	*	51.8±3.2
L2	*	*	6.3±0.4	*	24.7±2.0	*	*	*	*	31.1±2.4
L3	*	*	4.6±0.2	*	25.3±3.2	*	*	*	*	29.8±3.4
L4	*	*	6.3±0.3	*	27.5±1.0	*	*	*	*	33.9±1.4
L5	*	*	5.7±0.7	*	25.0±2.6	*	*	*	*	30.7±2.2

Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de cinco réplicas para las muestras de agua de lavado y al valor promedio \pm desviación estándar de tres réplicas para las muestras de lechuga iceberg cortada. WT1: agua de lavado procedente del tanque de prelavado. WT2: agua de lavado procedente del tanque de lavado. L1, L2, L3, L4, L5: muestras de lechuga iceberg cortada. * < LoQ. Parámetros físico-químicos del tanque de prelavado (WT1): cloro libre=5.9 mg L⁻¹; cloro total=24.1 mg L⁻¹; demanda química de oxígeno, DQO=1583 mg L⁻¹; pH=8.0. Parámetros físico-químicos del tanque de lavado (WT2): cloro libre=59.5 mg L⁻¹; cloro total = 97.2 mg L⁻¹; DQO=481 mg L⁻¹; pH= 7.9. Ver sección 1 (Objetivo), para identificación de los HAAs.

3. DISCUSIÓN

Con la desinfección del agua de lavado se reducen las cantidades totales de agua necesarias para las etapas de prelavado y lavado de las frutas y hortalizas (Manzocco y col., 2015), siendo la concentración residual del desinfectante uno de principales factores a considerar durante el proceso de desinfección, de manera que se evite una dosificación inadecuada por debajo de las concentraciones requeridas, con el riesgo de problemas de contaminación cruzada y el riesgo microbiológico para los productos lavados. Además, se debe evitar una dosificación excesiva del desinfectante para evitar sobrecostes, pero sobre todo reducir el riesgo químico debido a la formación y acumulación de DBPs en el agua de lavado y la captación por el producto vegetal lavado, ya que estos compuestos se consideran perjudiciales para la salud de la población (Gil y col., 2016; Gombas y col., 2017; Richardson y Plewa, 2020). Cada desinfectante está asociado a la formación de unos DBPs característicos, representando el cloro uno de los desinfectantes más utilizados y precursor en la generación de diversos tipos de DBPs y en gran cantidad, siendo los HAAs el segundo grupo más importante después de los THMs (Sinha y col., 2021; Simpson y Mitch, 2022;). Además de la concentración del desinfectante en el agua de lavado, otros parámetros operacionales del proceso de desinfección tales como el tipo y contenido de materia orgánica, la temperatura, el pH o los constituyentes del agua de lavado pueden inducir en la formación de estos DPBs (Domínguez-Tello, 2017; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021; Srivastav y col., 2020). Aunque no se han establecido niveles máximos de HAAs en agua de proceso o en producto vegetal, se necesitan metodologías adecuadas para su determinación y análisis en estas matrices, de manera que se pueda estudiar el comportamiento de estos subproductos en el agua de lavado, así como su posible absorción por el alimento vegetal, pudiendo ser un riesgo para la salud de los consumidores.

Para dar respuesta a este objetivo, se desarrolló y validó una metodología rápida y efectiva basada en el análisis de los 9 HAAs mediante UHPLC-MRM, en lechuga iceberg cortada y en el agua de lavado, realizando en el caso de la lechuga un proceso de extracción previo al análisis. Esta metodología resultó mucho más sencilla que algunas de las publicadas anteriormente, basadas en la realización de un laborioso proceso de derivatización previo al análisis de estos compuestos por cromatografía de gases acoplada a un detector de captura electrónica (GC-ECD) o de espectrometría de masas (GC-MS) (USEPA, 2003; Lee y col., 2018; Lee y col., 2019).

La validación de la metodología se realizó siguiendo las recomendaciones de la guía SANTE de “Procedimientos para el control de la calidad analítica y la validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos” (SANTE, 2019), donde en primer lugar se optimizaron las condiciones del espectrómetro de masas mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Únicamente se optimizaron las transiciones cualificadoras para cada uno de los HAAs, ya que las cuantificadoras habían sido descritas previamente (do Lago and Daniel, 2019). Los resultados mostraron que el ión producto formado para la mayoría de las transiciones cuantificadoras de los HAAs fueron la forma descarboxilada o del halógeno ionizadas. Otros autores proponen la utilización de los isótopos ^{37}Cl y ^{81}Br en la formación de los iones precursores, o incluso la combinación de los dos isótopos (^{35}Cl ^{37}Cl y ^{79}Br ^{81}Br) (Prieto-Blanco y col., 2012). En las transiciones optimizadas únicamente se utilizó el ^{81}Br para la transición cuantificadora del BDCAA. En cambio, la mayoría de las transiciones cualificadoras siguieron el mismo patrón que aquellas cuantificadoras, pero sustituyendo uno, dos o incluso los tres halógenos por su isótopo menos abundante (^{37}Cl y ^{81}Br), excepto en el caso del BCAA cuyos iones productos para la transición cuantificadora y cualificadora consistieron en la forma descarboxilada y el halógeno ionizado, respectivamente. Por otra

parte, atendiendo a las transiciones optimizadas y siguiendo los criterios de la guía SANTE (SANTE, 2019), se pudo comprobar que para cada uno de los HAAs la “relación de iones” en las matrices estudiadas (lechuga y agua de lavado) estuvo dentro del $\pm 30\%$ del promedio de los estándares de calibración de la misma secuencia, mostrando el cumplimiento de este criterio para ambas matrices.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la metodología optimizada y desarrollada se validó para lechuga iceberg fresca cortada y para el agua de lavado, atendiendo a criterios de selectividad, especificidad, evaluación de la curva de calibración y linealidad, LoQ, LoD, evaluación del efecto matriz, exactitud, estabilidad de los HAAs en las muestras de lechuga y agua de lavado y medición de la incertidumbre:

- La metodología utilizada para el análisis de los 9 HAAs resultó altamente específica y selectiva. Se utilizaron las transiciones optimizadas para identificar, inequívocamente cada uno de los 9 HAAs, así como para discriminar entre estos compuestos y cualquier otro analito que pudiera estar presente en la muestra. También se comprobó la ausencia de respuesta tanto en las matrices blancas estudiadas, así como en el solvente (agua ultrapura).
- El análisis estadístico sobre el conjunto de los datos derivados de la realización de las curvas de calibración en las diferentes matrices estudiadas mostró la heterocedasticidad de las varianzas de los resultados obtenidos (área del pico patrón HAA/área del pico ILIS), a lo largo de todo el rango de calibración. Por este motivo se optó por una calibración basada en mínimos cuadrados ponderados (WLS) en el que, considerando el valor de la varianza en cada punto de calibración, se les da

mayor importancia a los puntos con menor varianza que aquellos con mayor varianza (Raposo, 2016). Ésta es una calibración empleada en ocasiones para la determinación de analitos en concentraciones traza, cuando la calibración lineal ordinaria podría mostrar sesgo a concentraciones bajas (Sánchez, 2020). Asimismo, la calibración basada en WLS debería ser la técnica empleada en calibraciones con amplios rangos de concentración, los cuales cubren dos o incluso tres órdenes de magnitud y donde la heterocedasticidad de las varianzas es muy frecuente (Raposo y Ibelli-Bianco, 2020). Éste fue el caso de la metodología validada, donde el rango de concentración elegido para la calibración fue muy amplio ($\text{LoQ}-1000 \mu\text{g L}^{-1}$), de manera que se pudieron determinar los 9 HAAs en un único análisis, sin la necesidad de diluir la muestra, teniendo en cuenta que cada uno de los HAAs individuales pudiera estar en concentraciones muy diferentes en la muestra. Además, este tipo de calibración ha sido previamente descrita para la determinación de HAAs en muestras de agua (Postigo y col., 2020). En el caso de la metodología validada, el principio de linealidad de la curva de calibración, determinado a través del cálculo del porcentaje de error relativo (%ER) se cumplió a lo largo de todo el rango de concentraciones.

- o Los límites de detección (LoD) y cuantificación (LoQ), calculados para todas las matrices estudiadas, demostraron que la metodología desarrollada y validada se adaptó perfectamente para el análisis y control de los HAAs en la industria hortofrutícola y, especialmente de IV gama. Estos límites se encontraron muy por debajo de los valores máximos permitidos para aguas de consumo humano (USEPA, 1998; 2006; OMS, 2017; UE, 2020a) y se adaptaron perfectamente a los residuos de HAAs observados generalmente en la industria. Esto incluyó los LoD

y LoQ instrumentales, los cuales representaron los valores más bajos, como aquellos LoD y LoQ en las matrices estudiadas, y calculados mediante curvas de calibración tanto en solvente como en matriz, siendo las curvas de calibración en matriz la única calibración válida para aquellos HAAs cuyo análisis se vio afectado por el efecto matriz (Raposo y Barceló, 2021). Estudios previos para el análisis de HAAs mediante HPLC-MRM en muestras de agua revelaron límites inferiores. Sin embargo, en algunos de estos estudios no se siguieron unos criterios tan restrictivos como los utilizados para esta validación (Alexandrou y col., 2019; do Lago y Daniel, 2019). En otras publicaciones, aunque se realizó un cálculo similar al llevado a cabo en esta metodología, no se confirmaron estos valores con los criterios de veracidad y precisión establecidos (Prieto-Blanco y col., 2012). En este sentido, límites más próximos a los mostrados en esta validación han sido descritos para los diferentes HAAs en matrices de agua (Meng y col., 2010; Planas y col., 2019; Postigo y col., 2020).

- o El efecto matriz se evaluó como el aumento o la disminución de la respuesta de cada uno de los HAAs en las matrices estudiadas en comparación con la respuesta en solvente (SANTE, 2019). Este efecto puede ser definido como la medición del sesgo causada por la matriz en la que se encuentra el analito a determinar, pudiendo afectar a la capacidad de detección y análisis, así como a la veracidad y la precisión de las determinaciones. Los constituyentes de la matriz pueden afectar al proceso de ionización por electrospray, interfiriendo en la capacidad de evaporación de las gotas generadas por el nebulizador (Caban y col., 2012; Huang y col., 2012). Los resultados mostraron que las matrices estudiadas fueron relativamente complejas, causando efecto matriz y afectando a las determinaciones de BCAA en todas las

matrices, tanto en agua con una DQO de 400 y 800 mg L⁻¹ como en lechuga, así como de TBAA y CDBAA en lechuga. Aunque la utilización de patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) fue una estrategia adecuada para compensar el efecto matriz en algunos de los HAAs, debido a que su señal durante la ionización aumenta o se reduce de la misma forma que el ILIS correspondiente, no fue una solución adecuada para todos los casos (Caban y col., 2012). Como estrategia para compensar el efecto matriz en los HAAs indicados (BCAA, TBAA y CDBAA), se utilizaron curvas de calibración en matriz, excepto en aquellos casos donde una matriz libre de los compuestos a determinar no estuvo disponible, utilizando en estos casos una curva de calibración en matriz con adición estándar (Raposo y Barceló, 2021). Postigo y col. (2020), en su análisis para trece HAAs en agua de bebida mediante HPLC-ESI-MS, mostraron que la determinación del MCAA estuvo afectada por la matriz, siendo compensado con la utilización del correspondiente ILIS.

- o La exactitud de la metodología se estudió mediante la evaluación de la veracidad y la precisión. La veracidad se determinó calculando el % de recuperación absoluta, para evaluar la etapa de extracción de los compuestos a estudio, así como con el % de recuperación relativa, donde se evalúa el procedimiento analítico (Raposo y Ibelli-Bianco, 2020). Aunque para la matriz de lechuga sí se calculó el % de recuperación absoluta y el % de recuperación relativa, en el caso del agua de lavado, debido a que no se aplicó ningún procedimiento de extracción previo al análisis de los HAAs, la recuperación absoluta y relativa fueron coincidentes. Asimismo, todos los resultados mostraron que la metodología validada cumplió con los % de recuperación establecidos por los criterios de la guía SANTE, estando

éstos alrededor de 80-116%, para todos los HAAs en todas las matrices evaluadas. En cuanto a la precisión, evaluada como repetibilidad (RSD_r) y como precisión intermedia (RSD_{wr}), mostró buenos resultados para todos los HAAs (<22%) (SANTE, 2019), poniendo en evidencia la idoneidad de la metodología validada para las dos matrices estudiadas. Asimismo, otras metodologías validadas previamente para la determinación de HAAs en agua de bebida también mostraron buenos % de recuperación (80-121%), así como de RSD_r (<8.7%) y de RSD_{wr} (<12%) (Meng y col., 2010; Wang y col., 2020).

- Los estudios de estabilidad de los 9 HAAs en los extractos de lechuga y agua de lavado revelaron que las muestras de agua de lavado no deberían congelarse antes de su análisis. Las concentraciones de los HAAs se mantuvieron estables durante su almacenamiento a 4 °C durante 3 días y a -20 °C durante 21 días. Sin embargo, el MBAA se degradó antes de los 7 días durante su almacenamiento en congelación. Estudios similares demostraron la degradación de DBAA, TBAA, CDBAA y BDCAA tras 7 días en congelación, en muestras de agua desinfectadas con cloro y neutralizadas con ácido ascórbico (Postigo y col. 2020). Asimismo, Cardador y Gallego (2012), observaron la degradación de MCAA, MBAA, CDBAA y TBAA en lechuga iceberg tras su almacenamiento durante 36 horas a 4 °C y de DCAA, TCAA, BCAA, DBAA, BDCAA tras 3 días de almacenamiento en las mismas condiciones.
- La medición de la incertidumbre (MU) se realizó mediante una aproximación simplificada, utilizando los datos derivados del proceso de validación. Los % de MU expandida siguieron, para la mayoría de los casos, los criterios establecidos

por la guía SANTE, mostrando valores por debajo del 55% en todos los casos. En este sentido, debido al número de datos y a la complejidad de los cálculos necesarios para determinar este parámetro (EURACHEM/CITAC, 2012), no existen muchas publicaciones en las que la incertidumbre haya sido calculada como un paso más para el desarrollo y validación de una metodología analítica, especialmente si no se realiza como una aproximación simplificada a partir de los datos de validación obtenidos, tal y como se realizó en este estudio.

- Como último paso del proceso de validación, se realizó la verificación de la metodología desarrollada para el análisis de los 9 HAAs en muestras comerciales de lechuga iceberg cortada y en agua de lavado, ambas provenientes de una industria de IV gama. Los resultados confirmaron la presencia de los 9 HAAs en el agua de lavado, con concentraciones relativamente elevadas para algunos de ellos en el tanque de prelavado (WT1) y más bajas en el tanque de lavado (WT2), superando en algunos casos el límite máximo establecido para agua de bebida (USEPA, 1998; EC 2020). También se observó la presencia de DCAA y TCAA en el producto fresco. Estos resultados mostraron la utilidad y la aplicabilidad de la metodología validada para la determinación de los 9 HAAs en la industria de IV gama, demostrando la presencia en el agua de lavado y en el producto vegetal. Asimismo, la presencia de estos HAAs en este tipo de industrias puso en evidencia la necesidad de controlar los parámetros del proceso de desinfección para reducir la formación de HAAs, así como su acumulación en el agua de lavado y en el producto fresco. Parámetros como la mayor concentración de carga orgánica, así como una mayor dosificación de desinfectante en el tanque WT1 dieron lugar a una mayor concentración de HAAs (Stefán y col., 2019; Kali y col., 2021). El

mantenimiento de concentraciones elevadas de estos dos parámetros a lo largo del tiempo puede incrementar la acumulación de estos DBPs en el agua de lavado y en el producto fresco, pudiendo estimar que, si el muestreo se hubiera llevado a cabo unas horas más tarde, los valores de HAAs podrían ser incluso superiores (Fan y Sokorai, 2015). Asimismo, la metodología validada, en cuanto a su sencillez y rapidez de análisis, se podría aplicar para la monitorización de HAAs en este tipo de industrias, pudiendo realizar posteriormente una evaluación del riesgo de estos subproductos para el consumidor, todo ello como pasos iniciales para el establecimiento de una posible regulación de HAAs en la industria alimentaria.

CAPÍTULO VI

Influencia de los reguladores de pH empleados en la desinfección con cloro en la generación de cloro gas y en la formación de los subproductos de desinfección: cambios en las características físico-químicas y microbiológicas del agua de lavado

Marín, A., Tudela, J.A., Garrido, Y., **Albolafio, S.**, Hernández, N., Andújar, S., Allende, A., Gil, M.I. (2020). Chlorinated wash water and pH regulators affect chlorine gas emission and disinfection by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 1466-8564. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102533>.

1. OBJETIVO

Como se ha descrito anteriormente, para conseguir que el cloro en disolución acuosa esté en mayor proporción como ácido hipocloroso (HOCl), el cual presenta mayor poder antimicrobiano, es necesario ajustar el pH. En este estudio se profundizó acerca de la influencia de cuatro reguladores de pH, incluyendo ácido cítrico como ácido orgánico y otros tres ácidos inorgánicos como fueron ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico. En primer lugar, se evaluó la influencia de estos cuatro reguladores en la distinta distribución de las especies de cloro libre, ácido hipocloroso (HOCl) e ión hipoclorito (OCl^-), para establecer el rango de pH en la que la especie con mayor actividad desinfectante (HOCl) fuera máxima. Asimismo, tras la observación del drástico descenso de ambas especies del cloro (HOCl/ClO^-) con la utilización de ácido cítrico a valores de $\text{pH} < 4.5$, se estudió la posible implicación del ácido cítrico en la emisión de cloro gas (Cl_2). Por último, se realizó un estudio comparativo de los cuatro reguladores de pH en agua de lavado de lechuda, utilizando NaOCl y en un sistema dinámico que simuló un tanque de lavado de una línea comercial. Se determinó la influencia de los reguladores de pH en los cambios en las características físico-químicas y en la calidad microbiológica del agua de lavado, así como en la formación de los distintos DBPs tanto inorgánicos (clorato) como orgánicos (HAAs y THMs).

La metodología de este estudio se ha incluido en las secciones 2 (Generación del agua de lavado), 3 (Desinfección del agua de lavado), 6.1 (Análisis físico-químico y microbiológico), 7.2 (Métodos para el análisis del cloro. Método espectrofotométrico del DPD), 8 (Medición de las especies de cloro libre (HOCl/ClO^-)), 9 (Medición de cloro gas (Cl_2)) y 10 (Análisis de subproductos de desinfección (DBPs)).

2. RESULTADOS

2.1. Efecto de los reguladores de pH en la disponibilidad de ácido hipocloroso (HOCl) en agua clorada

Los resultados mostraron que las proporciones de cloro libre en forma de HOCl variaron en función del regulador de pH utilizado (**Figura 6.1**). Cuando se utilizó ácido cítrico para ajustar el pH, se observó una concentración de HOCl mayor al 90% en un pH entre 4.5-6.0. Sin embargo, la concentración de HOCl se redujo drásticamente a partir de un pH < 4.5, mostrando un descenso de un 50% en la concentración de esta especie a pH 4.0 y llegando incluso a no detectarse cuando la solución de agua clorada alcanzó un pH de 3.0 (**Figura 6.1 A**). Asimismo, cuando ácido fosfórico y ácido sulfúrico se utilizaron como reguladores de pH, ambos mostraron una tendencia similar en las proporciones de HOCl y ClO^- , en función del valor de pH alcanzado. Para ambos ácidos, la concentración de HOCl alcanzó valores superiores al 90% para valores de pH entre 3.0-6.0 (**Figura 6.1 B, C**). En cuanto al ácido carbónico, los resultados mostraron que cuando se utilizó este regulador de pH, el rango para el cual la concentración de HOCl superó el 90% se situó en valores entre pH 5.0-6.0. (**Figura 6.1 D**). Asimismo, tal y como se puede ver en los resultados, cuando se utilizó ácido carbónico como regulador, el pH del agua no se pudo bajar de 5.0, debido a que no fue posible solubilizar más CO_2 para formar ácido carbónico en el agua (Greenwood y Earnshaw, 1997).

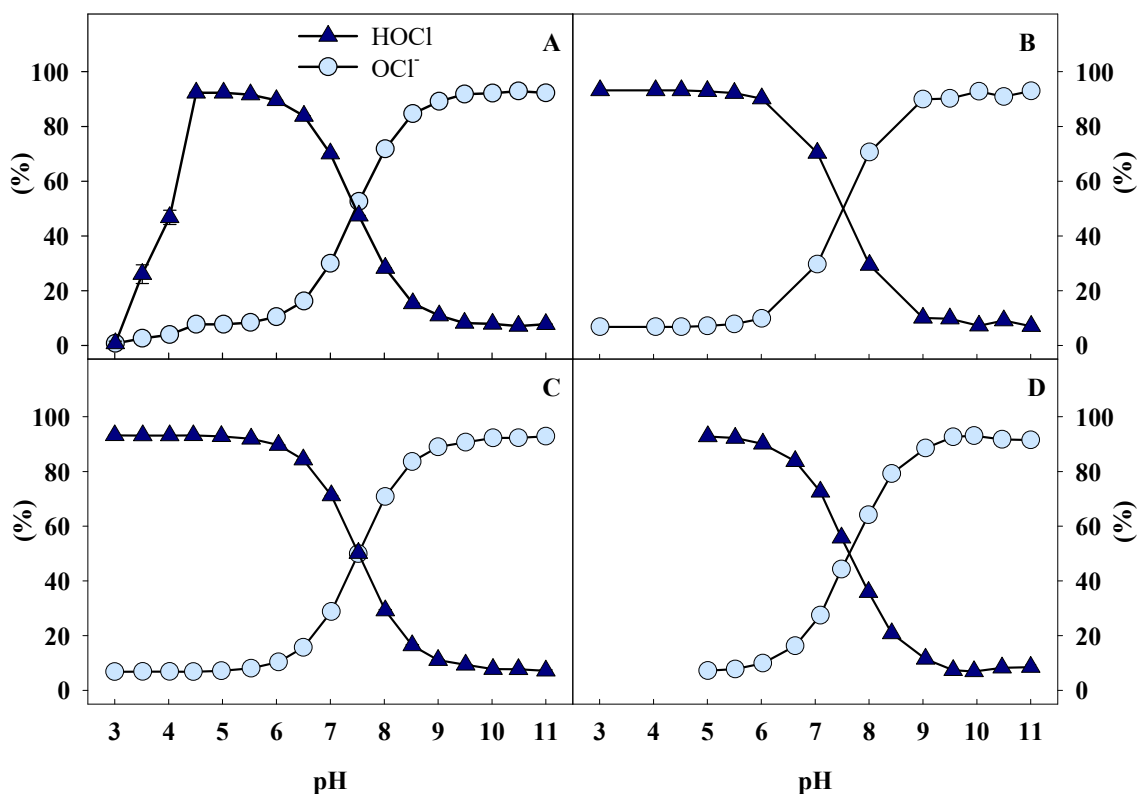


Figura 6.1. Porcentaje de cloro libre presente en agua clorada como ácido hipocloroso (HOCl) e ión hipoclorito (ClO^-), en función de pH y utilizando diferentes reguladores de pH: ácido cítrico (A), ácido fosfórico (B), ácido sulfúrico (D) y ácido carbónico (D). Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de cuatro réplicas.

2.2. Implicación del ácido cítrico en la emisión de cloro gas (Cl_2)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó un experimento para estudiar la reducción en las especies de cloro libre determinadas (HOCl y ClO^-) cuando ácido cítrico se utilizó como regulador a niveles de $\text{pH} < 4.5$ (**Figura 6.1 A**). Para ello, se estudiaron los cambios a concentraciones de cloro libre de 60, 80, 100 y 140 mg L^{-1} a tiempo 0 y pasados 15 minutos tras la adición del regulador de pH, comparando ácido cítrico con ácido fosfórico y ajustando el pH a 3.5 y a 5.0. Los resultados mostraron que cuando se utilizó ácido cítrico para ajustar el pH a 3.5, la concentración de cloro libre disminuyó tras 15 min de preparación, para todas las concentraciones iniciales de cloro

libre, excepto para la menor concentración estudiada (60 mg L^{-1}) (**Figura 6.2 A**). En cambio, cuando se utilizó este mismo ácido para ajustar el pH a un valor de 5.0, los niveles de cloro libre se mantuvieron constantes después de 15 min (**Figura 6.2 B**). Estos resultados pusieron en evidencia que la reducción observada en el cloro libre cuando se añadió ácido cítrico al agua clorada se vio afectada por el nivel inicial de cloro libre y el nivel de pH. Asimismo, se descartó la bajada de los niveles de cloro libre en favor de la formación de cloro combinado, ya que la concentración de cloro combinado se mantuvo constante entre su medición a tiempo 0 y pasados 15 min. Igualmente, tal y como era esperable, cuando se utilizó ácido fosfórico como regulador, los niveles de cloro libre se mantuvieron constantes tras 15 minutos, a los dos niveles de pH estudiados (3.5 y 5.0) (**Figura 6.2 C, D**).

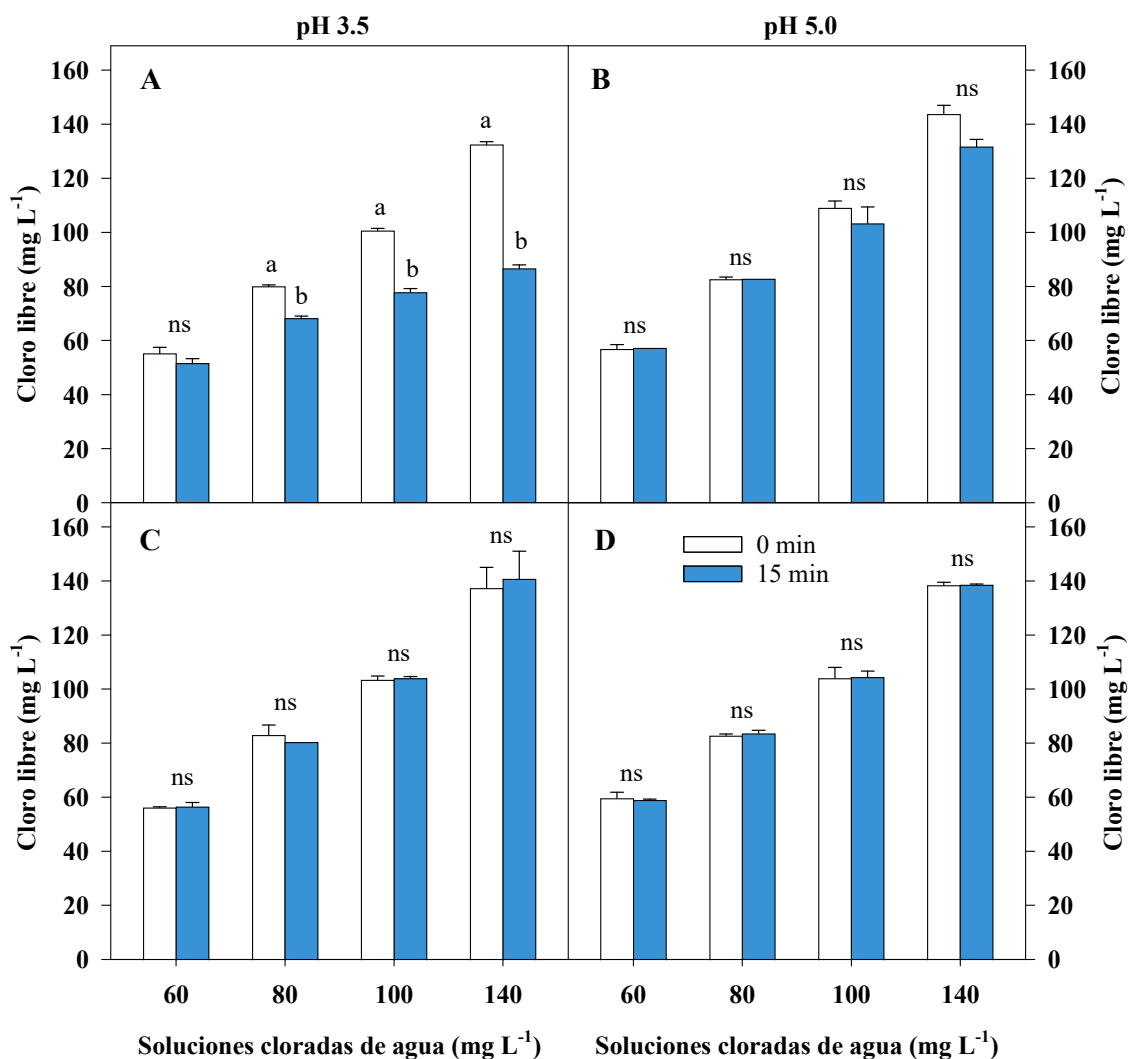


Figura 6.2. Cambios en la concentración de cloro libre con niveles de 60, 80, 100, 140 mg L⁻¹ a pH 3.5 y 5.0, cuando se utiliza ácido cítrico (A, B) y ácido fosfórico (C, D), como reguladores de pH, tras 0 min y 15 min de preparación. Las barras corresponden al valor promedio \pm desviación estándar de dos réplicas.

A la vista de los resultados obtenidos, se estudió la posible implicación del ácido cítrico en la formación de cloro gas (Cl₂), preparando distintas concentraciones de cloro libre (60-140 mg L⁻¹), ajustando el pH a 3.5 y 5.0 (utilizando ácido cítrico y fosfórico) y determinando la posible formación de Cl₂, tras 15 min de preparación. La concentración de Cl₂ se determinó por cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica GC-TCD. Ésta consistió en una determinación tentativa, debido a la falta de

disponibilidad de un patrón de Cl_2 . Los resultados mostraron la posible formación de Cl_2 cuando se utilizó ácido cítrico y el pH se ajustó a 3.5. En este caso, se observó una buena relación entre las concentraciones de cloro libre iniciales (60 y 140 mg L^{-1}) y la relación de área Cl_2 /área O_2 obtenidas cuando se utilizó ácido cítrico (datos no mostrados). Una concentración inicial de cloro libre de 140 mg L^{-1} mostró el mayor nivel de Cl_2 , mientras que 60 mg L^{-1} mostró el más bajo ($p < 0.001$). Igualmente, no se detectó Cl_2 cuando se utilizó ácido fosfórico como regulador de pH, independientemente de la concentración inicial de cloro libre y el nivel de pH. Asimismo, los datos correspondientes a todos los análisis realizados a pH 3.5 con ácido cítrico como regulador de pH se utilizaron para establecer correlaciones bilaterales, estableciendo una correlación significativa entre la determinación tentativa para el Cl_2 y la reducción de cloro libre tras 15 minutos de reacción (coeficiente de correlación de Pearson de 0.997, $p < 0.01$). Estos resultados pusieron en evidencia la posible emisión de Cl_2 en agua clorada con NaOCl , en presencia de ácido cítrico como regulador de pH.

2.3. Efecto de los reguladores de pH en las características físico-químicas del agua de lavado clorada

Para el estudio de la influencia de los reguladores de pH (ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico) en las características físico-químicas del agua de lavado de la lechuga, se realizaron cuatro ensayos utilizando un sistema dinámico. Durante cada uno de los ensayos, se añadió continuamente NaOCl en el tanque de lavado con el objetivo de satisfacer la demanda de cloro creciente, debido al continuo aporte de materia orgánica en el tanque, alcanzando valores máximos de DQO de 600-700 mg L^{-1} en todos los ensayos (**Tabla 6.1**). De esta manera se consiguió mantener la concentración de cloro libre alrededor de 25 mg L^{-1} , durante cada uno de los ensayos. Asimismo, los

cuatro reguladores de pH utilizados permitieron mantener el nivel de pH objetivo estable (pH 5.5) para alcanzar la máxima actividad antimicrobiana (**Tabla 6.1**). Cuando se utilizó ácido cítrico como regulador de pH, y al ser éste un ácido orgánico, provocó un incremento en la concentración de DQO, en comparación con el resto de ácidos. Los demás reguladores utilizados no influyeron en los niveles de DQO del agua de lavado de lechuga. El valor de DQO aportado por el ácido cítrico se sustrajo de los valores de la materia orgánica, para poder realizar la comparación entre los reguladores de pH. Asimismo, en cuanto al ORP, este parámetro superó los 800 mV para todos los reguladores de pH, mostrando ácido cítrico y ácido carbónico valores de ORP ligeramente superiores a ácido fosfórico y sulfúrico (**Tabla 6.1**). Igualmente, los diferentes reguladores de pH no afectaron a la cantidad total de cloro añadido para el mantenimiento de la concentración requerida de cloro libre (20-25 mg L⁻¹) en cada uno de los ensayos, aunque el volumen total de ácido fosfórico añadido al agua de lavado para ajustar el pH fue mayor que el utilizado para el resto de reguladores (**Tabla 6.1**). Tal y como se puede observar en los resultados, varios de los parámetros físico-químicos determinados mostraron diferencias estadísticamente significativas atendiendo al regulador de pH utilizado. Sin embargo, éstas no fueron cuantitativamente relevantes, por lo que se pudo concluir que los cuatro reguladores de pH utilizados no afectaron a las características físico-químicas del agua de lavado (**Tabla 6.1**).

Tabla 6.1. Características físico-químicas del agua de lavado de lechuga clorada comparando diferentes reguladores de pH, incluyendo la demanda química de oxígeno (DQO), pH, concentración de cloro libre y combinado, potencial de oxidación-reducción (ORP), cantidad de cloro añadido y de regulador de pH.

Regulador de pH	DQO (mg L ⁻¹)	pH	Cloro libre (mg L ⁻¹)	Cloro combinado (mg L ⁻¹)	ORP (mV)	Cloro añadido (mg)	Regulador de pH añadido (mL)
Ácido cítrico	83 - 708	5.5 ± 0.1a	24.7 ± 1.7b	4.3 ± 2.3	883.6 ± 14.2 a	1077	7.7
Ácido fosfórico	0 - 624	5.5 ± 0.1a	26.4 ± 1.7a	4.5 ± 2.3	860.8 ± 20.7 bc	1017	16.7
Ácido sulfúrico	0 - 612	5.5 ± 0.1a	25.4 ± 1.3ab	4.2 ± 2.6	849.9 ± 19.9 c	957	8.9
Ácido carbónico	14 - 610	5.2 ± 0.2b	24.9 ± 2.6b	3.5 ± 2.3ns	874.4 ± 19.1 ab	1032	NA

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de veinticinco réplicas. En el caso de la DQO, se muestra el rango entre los valores iniciales y finales. Valores con diferente letra en la misma columna muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$). Ns: no significativo.

2.4. Efecto de los reguladores de pH en la calidad microbiológica del agua de lavado clorada

Los resultados no mostraron diferencias en la calidad microbiológica del agua de lavado tratada con NaOCl, según el regulador de pH utilizado (**Figura 6.3**). Asimismo, tal y como se puede observar, las bacterias aerobias mesófilas totales se mantuvieron por debajo de 1.5 log UFC/100 mL en los cuatro ensayos realizados, por lo que se deduce que los distintos reguladores no interfirieron en el efecto bactericida del cloro en el agua de lavado, incluso con el aumento continuo de materia orgánica en el tanque, alcanzando niveles máximos de DQO ligeramente superiores a 600 mg L⁻¹, en todos los ensayos.

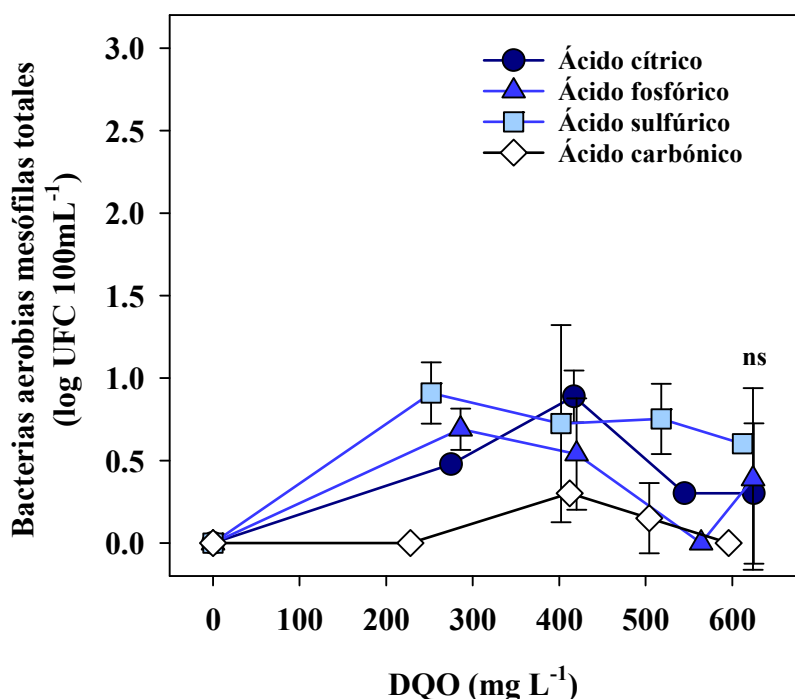


Figura 6.3. Cambios en la población de bacterias aerobias mesófilas totales en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5), con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO) y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de dos réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de significancia $p < 0.05$, para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). Ns: no significativo.

2.5. Efecto de los reguladores de pH en la formación de subproductos de desinfección (DBPs) en agua de lavado clorada

En cuanto a la influencia de los distintos reguladores de pH en la formación y/o acumulación de los DBPs analizados en el tanque de lavado, en primer lugar, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en cuanto a la acumulación de clorato a la mayor concentración de materia orgánica (DQO 600-700 mg L⁻¹) (**Figura 6.4**). La acumulación de clorato en el tanque de lavado y la cantidad de cloro añadida al agua de lavado durante cada uno de los ensayos, se ajustaron a una ecuación lineal con

un R^2 de 0.88 (**Tabla 6.1**). En este sentido, los resultados revelaron el continuo aumento de clorato en el tanque de lavado con el aumento de la materia orgánica, derivado del continuo aporte de cloro en forma de NaOCl, para mantener la concentración de cloro libre requerida durante cada uno de los ensayos. La cantidad de cloro aportada en cada uno de los ensayos fue similar, por lo que se deduce la similar formación y acumulación de clorato en cada uno de ellos, independientemente del regulador de pH utilizado (**Tabla 6.1**). Asimismo, tal y como se puede observar en la **Figura 6.4**, la concentración de clorato superó ampliamente el límite máximo establecido por la UE para agua potable (0.7 mg L^{-1}) (UE, 2020a).

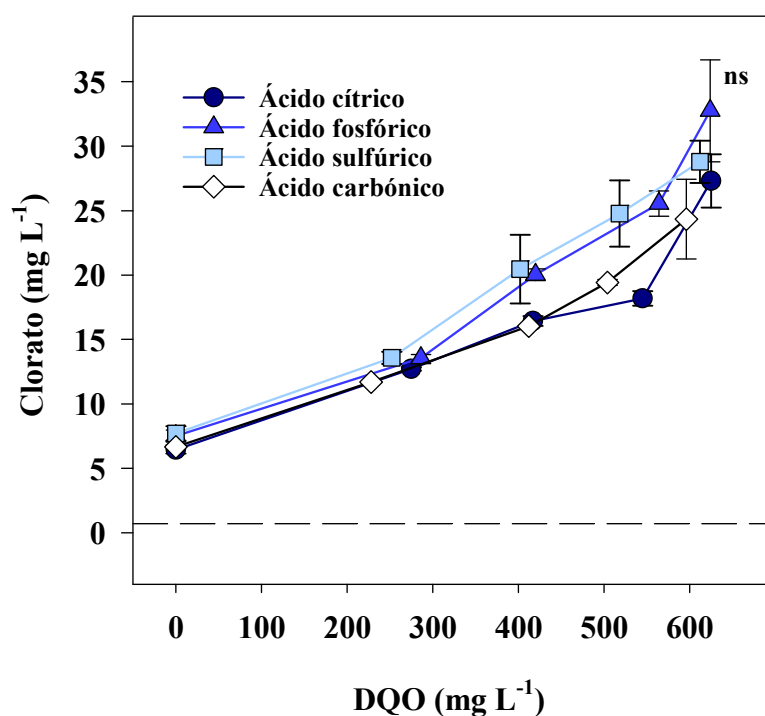


Figura 6.4. Cambios en el contenido de clorato en agua de lavado clorada ($20\text{-}25 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de significancia $p < 0.05$, para los datos al nivel de materia orgánica más elevado ($600\text{-}700 \text{ mg L}^{-1}$). Ns: no significativo. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7 mg L^{-1} establecido por la Unión Europea para agua potable.

En cuanto al contenido de HAAs y THMs, los resultados revelaron que los distintos reguladores de pH afectaron a la formación y acumulación de estos subproductos en el tanque de lavado. Los resultados mostraron que la acumulación de estos dos DBPs aumentó considerablemente con el incremento de la materia orgánica en el tanque de lavado, debido a la continua reacción del cloro con la materia orgánica añadida al agua de lavado. Sin embargo, la acumulación de HAA5 fue significativamente menor ($p < 0.01$) cuando se utilizó ácido cítrico como regulador de pH, en comparación con otros ácidos. Asimismo, aunque el análisis estadístico mostró diferencias significativas cuando el ácido sulfúrico se comparó con el resto de ácidos, éstas no fueron cuantitativamente relevantes (**Figura 6.5**). En contraposición, los resultados mostraron que la acumulación de THM4 fue significativamente mayor cuando se añadió ácido cítrico, en comparación con el resto de reguladores de pH ($p < 0.001$). El resto de reguladores no mostraron diferencias significativas en la formación de THMs (**Figura 6.6**).

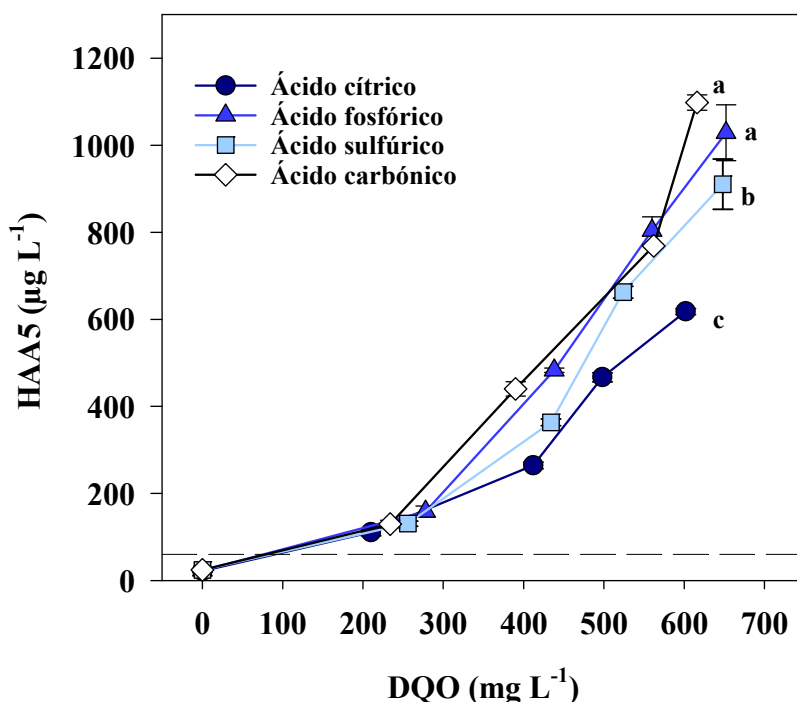


Figura 6.5. Cambios en el contenido de ácidos haloacéticos (HAA5) en agua de lavado clorada (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$), para los datos al nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L⁻¹). La línea discontinua muestra el límite máximo de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable.

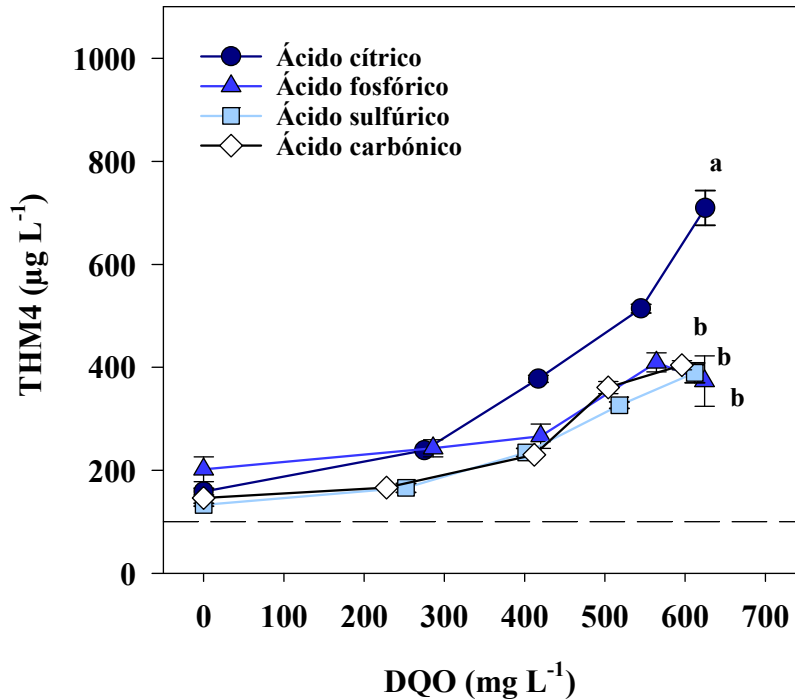


Figura 6.6. Cambios en el contenido de trihalometanos (THM4) en agua de lavado clorada ($20\text{-}25\text{ mg L}^{-1}$ de cloro libre a pH 5.5) con el aumento de la materia orgánica, determinada como demanda química de oxígeno (DQO), y comparando diferentes reguladores de pH. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Las diferentes letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$), para los datos al nivel de materia orgánica más elevado ($600\text{-}700\text{ mg L}^{-1}$). La línea discontinua muestra el límite máximo de $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea para agua potable.

Asimismo, los nueve HAAs individuales también fueron cuantificados y comparados, atendiendo al regulador de pH utilizado, mostrando en este caso diferencias significativas en cuanto a la cuantificación individual de estos subproductos (**Tabla 6.2**). Además, también se puede observar que, de manera general en los cuatro ensayos realizados, el DCAA fue el HAA predominante, seguido del TCAA y MCAA (**Tabla 6.2**). Las concentraciones recomendadas en las Guías para la calidad del agua de consumo humano de la OMS fueron sobrepasadas para algunos de estos HAAs, ya que se establecen niveles máximos para MCAA, DCAA y TCAA de 20 , 50 y $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$,

respectivamente (OMS, 2017). Asimismo, tal y como se puede observar, la suma de HAA5 superó ampliamente el nivel máximo de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, establecido por la UE y la USEPA para agua potable. En cuanto a los niveles de THM4, la acumulación de estos subproductos en el agua de lavado alcanzó valores cuatro veces superiores al límite máximo fijado para agua potable por la UE (100 $\mu\text{g L}^{-1}$), y por la USEPA (80 $\mu\text{g L}^{-1}$), principalmente cuando ácido cítrico se añadió al agua de lavado con una DQO superior a 500 mg L^{-1} (USEPA, 1998, 2006; UE, 2020a).

Tabla 6.2. Influencia de los reguladores de pH en el contenido de ácidos haloacéticos individuales y totales (HAA9) ($\mu\text{g L}^{-1}$) en agua de lavado clorada (20-25 mg L^{-1} de cloro libre y pH 5.5), para el nivel de materia orgánica más elevado (600-700 mg L^{-1}).

Compuesto	Reguladores de pH			
	Ácido cítrico	Ácido fosfórico	Ácido sulfúrico	Ácido carbónico
MCAA	35.3±2.9c	42.2±9.2bc	53.0±1.3b	78.4±8.6a
MBAA	3.8±0.8b	5.4±0.2a	2.8±0.6b	3.8±0.5b
DCAA	508.2±7.6c	883.4±53.9a	765.2±51.7b	925.7±11.8a
DBAA	12.0±0.5b	12.2±1.6b	13.6±0.0b	17.1±1.3a
TCAA	59.0±2.4c	85.6±2.5a	76.0±4.0b	73.0±1.7b
TBAA	5.4±0.2	6.3±0.5	5.3±1.0	5.7±0.4ns
BCAA	21.2±0.8d	52.2±2.9a	41.1±2.9b	34.9±0.6c
CDBAA	5.6±0.3b	8.2±0.7a	5.7±0.3b	6.4±1.2ab
BDCAA	5.6±0.9	7.0±1.3	5.4±0.6	5.7±0.5ns
HAA9	656.0±8.6c	1102.4±69.5a	968.1±60.3b	1150.7±15.3a

Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres réplicas. Valores con diferente letra en la misma fila muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de significancia honesta (HSD) de Tukey ($p < 0.05$). Ns: no significativo. Para la identificación de los ácidos haloacéticos: MCAA: ácido monocloroacético; MBAA: ácido monobromoacético; DCAA: ácido dicloroacético; DBAA: ácido dibromoacético; TCAA: ácido tricloroacético; TBAA: ácido tribromoacético; BCAA: ácido bromocloroacético; CDBAA: ácido clorodibromoacético; BDCAA: ácido bromodicloroacético.

3. DISCUSIÓN

Tal y como se ha explicado anteriormente, en solución acuosa el cloro se disocia en ácido hipocloroso (HOCl), ión hipoclorito (OCl⁻) y cloro gas (Cl₂). La distribución de estas especies es dependiente de pH, siendo el HOCl la especie dominante cuando el pH oscila entre 4 y 6, y el OCl⁻ la predominante bajo condiciones alcalinas (pH >7.0). En cambio, niveles muy bajos de pH favorecerán la formación de cloro gas (Cl₂) (Deborde y von Gunten, 2008; Desiderio y Nibbering, 2010; White y Martin, 2010). Es por este motivo por el que, durante las operaciones de lavado de las frutas y hortalizas, resulta imprescindible el mantenimiento de un rango de pH adecuado, de manera que se maximice la concentración del HOCl, siendo ésta la especie con la mayor capacidad antimicrobiana (Gombas y col., 2017; López-Gálvez y col., 2019). Aunque ha sido ampliamente estudiado el rango de pH en el que la especie HOCl es máxima, son limitados los estudios acerca de la influencia de distintos reguladores de pH en la formación de las especies de cloro. En el estudio llevado a cabo se evaluó la influencia de cuatro reguladores de pH (ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico) para el establecimiento del rango en el que la formación de HOCl fuese el máximo, utilizando agua clorada con NaOCl. Los resultados mostraron que un valor de pH por encima de 6.0 produjo un drástico descenso en el % de HOCl para los cuatro ácidos estudiados. Asimismo, se observaron diferencias entre los diferentes reguladores, mostrando ácido fosfórico y ácido sulfúrico un mayor rango de pH entre 3.0-6.0 donde la concentración de HOCl es la máxima (>90%), en comparación con ácido cítrico y ácido carbónico que presentan un menor rango de pH (entre 4.5-6.0 y 5.0-6.0, respectivamente). Los resultados observados por López-Gálvez y col. (2019), en líneas comerciales de lavado mostraron niveles de pH entre 6.5-7.5 utilizando cloro como desinfectante y ácido cítrico como regulador de pH, sin poder alcanzar la máxima actividad antimicrobiana.

Prueba de ello fueron los niveles de bacterias mesófilas aerobias cultivables en el agua de lavado de la línea de procesado. Suslow (2001) también recomendó un rango de pH mayor (6.5-7.0) para alcanzar la máxima concentración de HOCl. Sin embargo, diversos estudios muestran que la especie con mayor capacidad antimicrobiana (HOCl) sería la predominante a un $\text{pH} < 6.0$ (Deborde y von Gunten, 2008; Desiderio, 2010). Estos niveles se encuentran en consonancia con los resultados mostrados en el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral en el que, por primera vez, y teniendo en cuenta el impacto de cuatros reguladores de pH, se establece un rango de pH óptimo entre 5.0 y 6.0 para alcanzar la mayor capacidad antimicrobiana en la desinfección con cloro por la mayor abundancia de HOCl.

En cuanto a la utilización de ácido cítrico como regulador de pH, los resultados también mostraron un drástico descenso de ambas especies del cloro (HOCl/ClO^-) a un $\text{pH} < 4.5$, así como un descenso de un 50% en la concentración de HOCl a pH 4.0. Para explicar esta reducción en los niveles de cloro libre disponibles cuando el ácido cítrico es empleado como regulador de pH, se estudiaron los cambios en las diferentes concentraciones de cloro libre entre 60-140 mg L^{-1} a tiempo 0 y pasados 15 minutos tras la adición del regulador de pH, comparando en este caso ácido cítrico con ácido fosfórico, y a dos niveles de pH (3.5 y 5.0). Los resultados mostraron que, a partir de una determinada concentración de cloro libre ($> 80 \text{ mg L}^{-1}$), los niveles de cloro decrecieron después de 15 minutos tras la adición de ácido cítrico para disminuir el pH a 3.5, mientras que los niveles se mantuvieron a pH 5.0, así como en los ensayos realizados con ácido fosfórico. Asimismo, se descartó la bajada de los niveles de cloro libre en favor de la formación de cloro combinado, ya que la concentración de este último parámetro se mantuvo constante entre su medición a tiempo 0 y pasados 15 min. Aunque no existe mucha bibliografía al respecto, algunos estudios han observado la reducción del cloro

libre disponible en presencia de ácido cítrico y su posible relación con su volatilización en la forma de cloro gas (Cl_2), debido a la reacción entre el NaOCl y el ácido cítrico (Baumgartner y Ibay, 1987; Guerreiro-Tanomaru y col., 2011; Wright y col., 2017b).

Teniendo esto en cuenta, se estudió la posible implicación del ácido cítrico en la formación de Cl_2 . De esta forma, se realizó una determinación de Cl_2 tras 15 minutos de reacción, en las condiciones anteriormente indicadas (cloro libre: $60\text{-}140\text{ mg L}^{-1}$; pH 3.5 y 5.0, utilizando ácido cítrico y ácido fosfórico). Esta determinación se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica (Hunt y Alder, 1996). Asimismo, esta determinación fue tentativa, debido a la falta de disponibilidad de un patrón de Cl_2 . Los resultados mostraron una relación entre la concentración inicial de cloro libre presente en las muestras de agua y los valores tentativos para la concentración de Cl_2 (área Cl_2 /área O_2), pasados 15 minutos tras la adición de ácido cítrico a pH 3.5 ($p < 0.001$). De esta manera, la relación área Cl_2 /área O_2 , y por tanto la posible formación de Cl_2 , fue máxima para una concentración inicial de 140 mg L^{-1} de cloro libre, y mínima para una concentración de 60 mg L^{-1} de cloro libre. En contraposición, no se detectó Cl_2 en los casos en los que se utilizó ácido fosfórico como regulador de pH, ni cuando se utilizó ácido cítrico en un rango superior de pH (pH 5.0). Asimismo, también se observó una correlación significativa entre la determinación tentativa para el Cl_2 y la reducción de cloro libre tras 15 minutos de reacción con ácido cítrico a pH 3.5 (coeficiente de correlación de Pearson de 0.997, $p < 0.01$). A pesar de que el pH se mantuvo a 3.5, la formación de Cl_2 dependió de la concentración de cloro libre ya que cuando se utilizó ácido cítrico para ajustar el pH a un nivel de 3.5, la concentración de cloro libre no disminuyó tras 15 min de preparación cuando la concentración de cloro libre fue menor (60 mg L^{-1}). Esto puso en evidencia que la reducción observada en el cloro libre, y en consecuencia la formación de Cl_2 se puede ver afectada por el nivel inicial de cloro libre,

el nivel de pH o la cantidad de ácido cítrico añadida para regular el pH al nivel indicado. Estos resultados son especialmente relevantes para la industria de procesado de frutas y hortalizas debido a que el empleo de ácido cítrico como regulador de pH en este tipo de procesos está generalizado, pudiendo estar relacionado con la volatilización del Cl₂, siendo ésta una especie nociva para los trabajadores, por ser irritante de las mucosas y del sistema respiratorio (INSST, 1994; Suslow, 1997; Deborde y von Gunten, 2008; Desiderio y Nibbering, 2010; White y Martin, 2010; Fan y Sokorai, 2015).

Posteriormente, también se realizó un estudio comparativo de los cuatro reguladores de pH durante la desinfección de agua de lavado de lechuga con NaOCl, y utilizando una planta piloto consistente en un sistema dinámico, simulando un tanque de lavado de una planta comercial, con la finalidad de determinar la influencia de los distintos reguladores en las características físico-químicas y la calidad microbiológica del agua de lavado, así como en la formación de distintos DBPs inorgánicos (clorato) y orgánicos (HAAs y THMs). En cuanto a las características físico-químicas del agua de lavado, no se observaron grandes diferencias atendiendo al regulador de pH utilizado. En los cuatro ensayos llevados a cabo se alcanzaron niveles de materia orgánica similares (DQO: 600-700 mg L⁻¹), aunque el ácido cítrico, al ser un ácido orgánico, incrementó los niveles de materia orgánica en el primer punto de muestreo, donde el agua de lavado aún no había entrado en el tanque. Sin embargo, el resto de parámetros de la desinfección no mostraron diferencias cuantitativamente significativas cuando se compararon los cuatro ácidos estudiados, manteniéndose éstos dentro de los límites operaciones requeridos (cloro libre: 24.7-26.4 mg L⁻¹; pH: 5.2-5.5; ORP: 849.9-883.6 mV). En cuanto al potencial de oxidación-reducción (ORP), tal y como se ha indicado anteriormente, su valor no puede utilizarse como parámetro de monitorización del cloro libre presente en el agua de lavado. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud estableció en su Guía para la

calidad del agua de consumo humano que un valor de ORP de 650 mV provoca una desinfección instantánea en agua de bebida. Asimismo, se ha demostrado una inactivación en menos de 30 s con valores de ORP entre 650-700 mV, para *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* o coliformes termotolerantes (Suslow, 2004; OMS, 2017; Van Haute y col., 2019).

En los cuatro ensayos realizados, las bacterias aerobias mesófilas totales (TAB) se mantuvieron por debajo de 1.5 log UFC 100 mL⁻¹, no mostrando diferencias significativas atendiendo al regulador utilizado. Estos resultados ponen en evidencia que la calidad microbiológica del agua de lavado no depende del regulador de pH, sino del mantenimiento de los parámetros de la desinfección dentro de los límites operacionales requeridos. En los ensayos realizados se demostró un control de las bacterias aerobias totales con una concentración de cloro libre de 20-25 mg L⁻¹ y un pH de 5.5. Sin embargo, es cierto que los parámetros operacionales para la desinfección del agua de proceso deben ser adaptados para cada planta y línea de proceso, dependiendo del tipo de producto y el diseño de la planta. Tudela y col. (2019b), establecieron el mantenimiento de distintas concentraciones residuales de cloro libre atendiendo a la concentración de BAT en el agua de lavado (desde 10 a >30 mg L⁻¹), dependiendo del tipo de producto (cebolla picada, lechuga cortada, col rallada, brotes tiernos) y del procesado llevado a cabo. En este sentido, se establecieron concentraciones intermedias (20-25 mg L⁻¹ de cloro libre) a pH 5.5 ajustado con 1M de ácido fosfórico, para lechuga cortada con una DQO máxima de 900 mg L⁻¹.

En cuanto a la influencia de los distintos reguladores de pH en la formación de DBPs, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en cuanto a la formación y acumulación de clorato en el tanque de lavado. El clorato se forma como subproducto de degradación del cloro, por lo que un aumento en la dosis de desinfectante

(NaOCl), influye en la formación de estos DBPs. En disolución acuosa el NaOCl se disocia en las formas activas del cloro (HOCl/CIO⁻). La degradación del CIO⁻ resultaría en la formación de clorato (ClO₃⁻), con un paso previo de formación de clorito (ClO₂⁻) (AHDB, 2016). Durante los cuatro ensayos realizados, conforme aumentaba la materia orgánica en el tanque de lavado, se produjo también un aumento en la demanda de cloro necesaria para mantener la concentración residual requerida, aumentando la concentración de clorato en el tanque. En los cuatro ensayos se demostró la relación entre el cloro añadido en forma de NaOCl y la acumulación de clorato en el tanque de lavado, por lo que la continua adición de cloro en el tanque produjo la incorporación y acumulación de clorato en el mismo (Gil y col., 2016). En los distintos ensayos realizados se añadió un volumen similar de NaOCl, por lo que la acumulación de clorato fue similar en todos ellos e independiente del regulador utilizado. Esta concentración superó ampliamente el límite máximo establecido por la UE para agua potable (0.7 mg L⁻¹) (UE, 2020a). Asimismo, aunque el nivel máximo no está regulado para agua de proceso, sí lo está para determinadas frutas y hortalizas, habiendo sido establecido un límite máximo de 0.7 mg kg⁻¹ para la lechuga (UE, 2020c). Gil y col. (2016), demostraron que los residuos de clorato en lechuga lavada correspondían aproximadamente al 10% de la concentración presente en el agua de lavado. Asimismo, Garrido y col. (2019) revelaron que la captación de clorato por el producto aumentó con la concentración de este DBP en el agua, así como con el aumento del tiempo de lavado. Esta captación fue también dependiente del tipo de producto, disminuyendo con el tamaño de corte durante el procesado, y aumentando con el menor contenido en agua del producto. En los ensayos realizados, el contenido medio de clorato alcanzado en el agua de lavado fue de 28 mg L⁻¹, resultando evidente el riesgo de captación de este subproducto por el producto, pudiendo superar el valor máximo establecido por la UE. La incorporación de un

prelavado mediante un sistema de duchas podría reducir la concentración de materia orgánica en el tanque de lavado, reduciendo la demanda de cloro y repercutiendo en un menor contenido en clorato en el agua de lavado y en el producto.

En cuanto al contenido en HAAs y THMs, en los cuatro ensayos realizados se demostró un aumento en la concentración de estos dos DBPs, con el aumento de la materia orgánica y la continua adición de cloro. Tanto los HAAs como los THMs se forman, principalmente, debido a la reacción de los desinfectantes clorados con la materia orgánica presente en el agua, por lo que el aumento de ésta, así como de la dosis de desinfectante son dos parámetros que influyen profundamente en la formación de estos dos grupos de DBPs (Domínguez-Tello, 2017; Srivastav y col., 2020; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021;). Igualmente, la presencia de aniones bromuro en el agua de lavado incide en la formación de los HAAs y THMs bromados (Zhang y col., 2015). En cuanto a la comparación de los distintos reguladores de pH en la formación de estos DBPs, los resultados mostraron que hubo diferencias significativas en la formación de HAAs y THMs, en función del regulador utilizado. Aunque no hubo diferencias cuantitativamente significativas en la comparación del resto de ácidos, los ensayos realizados con ácido cítrico mostraron la mayor acumulación de THMs ($710 \mu\text{g L}^{-1}$) pero la menor acumulación de HAAs ($618 \mu\text{g L}^{-1}$) en el agua de lavado en su máximo contenido en materia orgánica (DQO 600-700 mg L^{-1}). Asimismo, aunque la influencia del rango de pH en la formación de HAAs y THMs ha sido ampliamente estudiada, no se ha profundizado en el efecto de los distintos reguladores en la formación de estos dos subproductos clorados. De manera general, niveles de pH entre 6.0 y 8.0 facilitan las reacciones de halogenación, así como de hidrólisis de DBPs intermediarios, relacionadas con la formación de los THMs. En cuanto a los HAA, aunque existen ligeras excepciones en cuanto al ácido dicloroacético (DCAA) y algunos HAAs trihalogenados, de forma

general su formación disminuye a pHs elevados, aumentando su generación a pHs cercanos a 4.0 y manteniéndose estables en un rango de pH entre 6.0 y 8.0 (Liang y Singer, 2003; Kali y sol., 2021; Sinha y col., 2021). Fan y Sokorai (2015) estudiaron ampliamente la formación de triclorometano (TCM), el principal THM, en agua de lavado y en producto, utilizando distintos parámetros de desinfección y la utilización de dos reguladores de pH (ácido cítrico y fosfato de sodio). Los resultados mostraron que cuando se añadió ácido cítrico para ajustar el pH (6.5) a soluciones de NaOCl, los niveles de TCM producidos fueron mayores que aquellos cuantificados con la solución tamponada con fosfato de sodio, tras 5 min de incubación. Resultados que no cambiaron significativamente tras la adición de zumo de lechuga. Sin embargo, tras 30 min de incubación no se observaron diferencias significativas en la concentración de TCM entre los dos reguladores de pH. Estos autores concluyeron que el ácido cítrico reaccionó con el cloro, aumentando significativamente los niveles de TCM en el agua de lavado. También apuntaron que, en presencia de materia orgánica, el cloro reaccionó con ésta más rápidamente, disminuyendo la reacción de este desinfectante con el ácido cítrico. En este sentido, las reacciones del HOCl con el ácido cítrico en favor de la formación de TCM han sido descritas, aunque a un pH ligeramente superior al estudiado, interviniendo reacciones de halogenación, descarboxilación y enolización (Larson, 1978; Fan y Sokorai, 2015).

Los resultados también mostraron que, aunque la utilización de ácido cítrico favoreció la mayor formación de THMs, paralelamente repercutió en la menor generación de HAAs, comparado con el resto de ácidos. Este hecho es difícil de justificar debido a la complejidad de las reacciones que contribuyen a la formación de los DBPs, ocurriendo muchas de ellas de manera simultánea e interviniendo incluso la formación de DBPs intermediarios, generándose durante la desinfección de las aguas, aunque

descomponiéndose rápidamente, mediante hidrólisis o reaccionando con el desinfectante residual (Hong y col., 2013; Ding y col., 2018; Stefán y col., 2019; Sun y col., 2019; Kali y col., 2021). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que los HAAs y algunos otros DBPs trihalogenados podrían formar THMs vía hidrólisis (Zhang y col., 2015). Asimismo, Xiang y col. (2005) estudiaron la transformación del ácido tricloroacético (TCAA) en TCM, en aguas dulces superficiales. Aunque estos autores realizaron sus estudios a un pH ligeramente superior al estudiado, concluyeron que algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico podrían promover la transformación TCAA en TCM.

Asimismo, la concentración de HAAs y THMs en el agua de lavado de todos ensayos realizados superó ampliamente los límites máximos permitidos para agua potable. Éste fue el caso de los HAAs, cuyos valores máximos superaron en unas 20 veces los valores máximos permitidos ($60 \mu\text{g L}^{-1}$), tanto por la UE como por la USEPA. En cuanto a los THM₄, aunque sus concentraciones fueron mayores en el caso de la utilización del ácido cítrico, los valores máximos alcanzados con el resto de reguladores también superaron los límites máximos establecidos por la UE ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) y la USEPA ($80 \mu\text{g L}^{-1}$) (USEPA, 1998, 2006; UE, 2020a). En esta línea, aunque no se han regulado los límites de estos DBPs para agua de proceso o producto vegetal, teniendo en cuenta las altas concentraciones mostradas en el agua de lavado, sería necesario considerar el posible riesgo de captación de estos subproductos por el producto fresco. Asimismo, la elevada concentración de estos subproductos también debe ser considerada desde el punto de vista medioambiental, en el caso de que se produzca el vertido de las aguas de proceso generadas en la industria agroalimentaria (Fan y Sokorai, 2015). En cuanto a los THMs, publicaciones previas han establecido una captación de este subproducto en agua de lavado clorada de un 4% para espinacas baby y de un 15% para lechuga cortada (López-Gálvez y col., 2010; Gómez-López y col., 2013). Asimismo, Coroneo y col. (2017),

realizaron un estudio sobre la presencia de THMs en 115 muestras, incluyendo distintos productos de IV gama. Concluyeron que la captación potencial de THMs durante el proceso de lavado podría causar un riesgo potencial a los consumidores, ya que el 95% de los productos analizados mostraron la presencia de THMs, con un valor medio de 76.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, alcanzando un valor máximo de 1085 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Igualmente, Cardador y Gallego (2012), tras la determinación de HAAs en productos mínimamente procesados, incidieron en la captación de estos DBPs durante las etapas de lavado, hasta el producto final comercializado. Teniendo esto en cuenta, y tal y como se ha indicado para clorato, la incorporación de un prelavado podría reducir la concentración de materia orgánica en el tanque de lavado y por tanto la formación de estos subproductos. Asimismo, diversos estudios apoyan que la presencia de estos DBPs en el producto fresco se podría reducir considerablemente ante la incorporación de un enjuague final en la línea de procesado (Van Haute y col., 2013; Fan y Sokorai, 2015; Zhang y col., 2022).

Por último, teniendo en consideración todos los resultados expuestos en cuanto a la diferente respuesta de los distintos reguladores de pH estudiados (ácido cítrico, fosfórico, sulfúrico y carbónico), tanto en los parámetros de desinfección como su incidencia en la formación de los DBPs (clorato, HAAs y THMs), se podría concluir que el ácido fosfórico sería el más apropiado para su utilización en aguas de lavado cloradas. Este ácido mostró un amplio rango de pH (3.0-6.0) para alcanzar la máxima concentración de HOCl, en comparación con ácido cítrico y carbónico. Asimismo, al contrario que el ácido cítrico, no se ha relacionado con la generación de Cl_2 durante el proceso de desinfección ni con la formación de DBPs, especialmente THMs. Por último, constituye un ácido débil, en comparación con ácido sulfúrico, siendo este último un ácido fuerte, corrosivo, y menos apropiado para su manejo y para el correcto mantenimiento de las instalaciones de una planta de procesado.

CAPÍTULO VII

Estudio de la influencia de los tratamientos terciarios de desinfección con cloro, ácido peracético (PAA), UV, cloro/UV y PAA/UV en la formación de subproductos de desinfección (trihalometanos, ácidos haloacéticos y clorato) en aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales y destinadas al riego agrícola

Albolafio, S., Marín, A., Allende, A., García, F., Simón-Andreu, P.J., Abellán-Soler, M., Gil, M.I. (2022). Strategies for mitigating chlorinated disinfection byproducts in wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 288 (2), 132583. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132583>.

1. OBJETIVO

En el estudio llevado a cabo, se profundizó sobre la influencia de los tratamientos terciarios de desinfección con cloro, ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), y las combinaciones de cloro/UV y PAA/UV en la formación de los subproductos de desinfección (DBPs) trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) y clorato, en aguas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y destinadas al riego agrícola. Para ello, se tomaron muestras de 15 EDARs ubicadas en varias localidades de Murcia, siendo 4 de ellas depuradoras de grandes zonas urbanas (B, E, F y L) y 11 de localidades de menor tamaño (A, C, D, G, H, I, J, K, M, N, O) (ver **Tabla 7.1** para la identificación de las EDARs). Se realizaron muestreos durante 13 semanas consecutivas, entre los meses de junio a diciembre de 2020. Las depuradoras de menor tamaño fueron muestreadas una vez al mes y las de mayor tamaño dos veces al mes, tomando muestras tanto del influente a la entrada de la depuradora, como del efluente a la salida tras los tratamientos terciarios, con la finalidad de estudiar aquellos tratamientos de desinfección que pudieran prevenir la acumulación de los DBPs en las aguas regeneradas. Asimismo, debido a que los muestreos de las aguas residuales se realizaron durante la pandemia de COVID-19 y con la finalidad de evitar cualquier riesgo microbiológico derivado de la presencia potencial del virus SARS-CoV-2 en los influentes de las aguas muestreadas, se estudió la aplicación de un protocolo de inactivación previo al análisis de los DBPs y su efecto en la cuantificación de los mismos. Para ello se compararon dos protocolos de inactivación: un método basado en la adición de fenol e isotiocianato de guanidina y otro método basado en la adición de paraformaldehído (PFA), adaptados ambos a las aguas residuales estudiadas. Los dos protocolos de inactivación descritos se compararon utilizando aguas de efluentes tratadas

con los cinco tratamientos de desinfección (cloro, PAA, UV, cloro/UV, PAA/UV) provenientes de cinco EDARs.

La metodología de este estudio está incluida en las secciones 4 (Muestreos en Estaciones Depuradoras de aguas Residuales (EDARs)), 6.1 (Análisis físico-químico y microbiológico), 7.1 (Métodos para el análisis del PAA. Método cronoamperométrico), 7.2 (Métodos para el análisis del cloro. Método cronoamperométrico) y 10 (Análisis de subproductos de desinfección (DBPs)).

2. RESULTADOS

2.1. Características de las EDARs y determinaciones físico-químicas de las aguas

Las 15 EDARs objeto de estudio presentaban características muy distintas en cuanto a su dimensión, funcionamiento y a los sistemas de desinfección empleados para el tratamiento de sus aguas. Aunque los tratamientos fueron variables en función de la EDAR, de manera general, las aguas residuales se sometieron a un pretratamiento para eliminar los sólidos gruesos y finos, incluyendo operaciones de desarenado-desengrasado, seguido de un tratamiento primario para la eliminación de la materia en suspensión y parte de la materia orgánica de entrada a la depuradora, con sistemas de aireación y distintos sistemas de decantación para el depósito de los sólidos sedimentables. El tratamiento biológico o secundario eliminó la materia orgánica biodegradable, utilizando distintas tecnologías aerobias o anaerobias para ello, seguido de una decantación secundaria. En el tratamiento terciario destacaron los sistemas de coagulación-floculación con una posterior decantación. Seguidamente, las aguas se sometieron a distintos tratamientos de desinfección con cloro, PAA, UV, y las combinaciones de cloro/UV y PAA/UV, excepto en una de las depuradoras (EDAR-M),

donde los efluentes se sometieron a un tratamiento final secundario con una tecnología consistente en un biofiltro electroactivo (BE). Esta tecnología se basa en un proceso electroactivo biológico empleando microorganismos. Se dispone de una información muy limitada de esta tecnología. El agua percola a través de un material electroconductor, colonizado por microorganismos que forman una biopelícula. Éstos oxidan la materia orgánica y los electrones generados en su metabolismo son transferidos a través del material electroconductor, favoreciendo las reacciones de oxidación-reducción de las distintas comunidades microbianas presentes en el lecho filtrante y aumentando la degradación de los contaminantes presentes en las aguas residuales. Este sistema también cuenta con trampas de electrones o chimeneas electroactivas, con membranas de intercambio iónico, permitiendo el intercambio electrolítico con el lecho filtrante colonizado por los microorganismos, así como de sensores para la medición de la actividad metabólica microbiana y en consecuencia de la calidad de las aguas tratadas. La información general de cada EDAR, así como la fecha de cada muestreo, y el tratamiento aplicado (cloro, PAA, UV, cloro/UV, PAA/UV o biofiltro electroactivo) se describe en la **Tabla 7.1**.

Tabla 7.1. Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), localización, fechas de muestreo (día y mes) y sistemas de tratamiento o desinfección: cloro, ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV, PAA/UV y biofiltro electroactivo (BE).

EDARs	Localización	1 (23/6)	2 (7/7)	3 (21/7)	4 (4/8)	5 (25/8)	6 (8/9)	7 (22/9)	8 (6/10)	9 (20/10)	10 (3/11)	11 (17/11)	12 (1/12)	13 (15/12)
A	Benizar	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
B	Bullas	UV	UV	UV	UV	UV	UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	UV	UV	UV	UV
C	Calar de la Santa	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
D	Cañada de la Cruz	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
E	Caravaca de la Cruz	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	PAA/ UV	PAA/ UV	PAA/ UV	PAA/ UV	PAA/ UV
F	Cehegín	UV	Cloro	Cloro	UV	UV	UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	UV	UV	UV	UV	PAA/ UV
G	El Chaparral	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
H	El Moral	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	

I	El Moralejo	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
J	Los Royos	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
K	Mazuza	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
L	Moratalla	Cloro	Cloro	UV	UV	UV	UV	Cloro/ UV	Cloro/ UV	UV	UV	UV	UV	UV
M	Otos	BE	BE		BE		BE		BE		BE		BE	
N	Sabinar	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	
O	Valentín	Cloro	Cloro		Cloro		Cloro		Cloro		PAA		PAA	

El número de tratamientos aplicados fue de 129, de los cuales 54=cloro, 20=PAA, 27=UV, 15=cloro/UV, 6=PAA/UV y 6=BE.

Debido a las condiciones específicas de cada EDAR y al diferente tamaño de la población donde están ubicadas, tanto el caudal de agua de entrada a la depuradora, como la dosis de desinfectante aplicada, y la concentración residual fue muy diferente, en primer lugar, atendiendo a la depuradora estudiada, pero también dependiendo del muestreo realizado. Asimismo, algunas de la EDARs cambiaron de sistema de desinfección a lo largo de los distintos muestreos realizados (**Tabla 7.1**). Los parámetros físico-químicos de todas las aguas muestreadas para cada una de las EDARs, tales como pH, conductividad eléctrica (CE), cloro libre, demanda química de oxígeno (DQO), dosis de cloro y de PAA aplicadas y caudal de entrada a la depuradora se incluyen en la **Tabla 7.2**. Teniendo en cuenta los parámetros físico-químicos analizados, en las EDARs que utilizaron cloro como sistema de desinfección, las concentraciones de cloro libre fueron relativamente variables, situándose en un rango entre 0.1 y 3.0 mg L⁻¹. En el caso del PAA, éste alcanzó concentraciones entre 4.0 y 5.0 mg L⁻¹, en todos los muestreos. Los tratamientos combinados cloro/UV y PAA/UV se aplicaron de manera simultánea en canales abiertos o tubos cerrados, atendiendo a la EDAR estudiada (**Tabla 7.2**). Asimismo, los efluentes de todas las EDARs mostraron valores de pH y de CE muy similares. En cuanto al pH, éste varió entre 6.0-7.0, siendo ligeramente más elevado que los valores recomendados para alcanzar la máxima actividad antimicrobiana en la desinfección con cloro (pH 5.0-6.0). Igualmente, aunque los valores para CE fueron relativamente constantes y similares para las distintas EDARs, algunas de ellas mostraron valores relativamente altos (EDAR-B y E) (**Tabla 7.2**). Además de esto, el contenido en materia orgánica, expresado mediante la DQO, varió considerablemente entre los influentes de las distintas EDARs, con valores tan bajos como 102 mg L⁻¹ o tan elevados como 6253 mg L⁻¹. Sin embargo, los valores de DQO se redujeron diez veces tras el

tratamiento de las aguas, obteniendo unos efluentes con un bajo contenido en materia orgánica, aunque variando ligeramente según la EDAR muestreada (**Tabla 7.2**).

Tabla 7.2. Parámetros físico-químicos de los influentes (IN) de entrada a la depuradora y de los efluentes (EF) tras los distintos tratamientos en 15 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) (A-O). Ver **Tabla 7.1** para identificación de la EDARs.

A (Benizar)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.3	8.1	8.4	7.7			8.2	7.7			8.7	8.0			8.5	8.0			8.4	7.8			8.8	7.3		
CE	1.3	0.9	1.3	1.0			1.6	1.1			1.5	1.0			1.2	1.0			1.3	1.0			1.1	0.7		
FC		0.8		0.6				0.5-1				0.5				1.5										
DQO	449	21	526	40			435	41			440	37			337	35			781	33			353	24		
Cloro				118				120				100				150										
PAA																				5				5		
Caudal	117		108				112				94				129				105				77			

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm⁻¹); FC: cloro libre (mg L⁻¹); DQO: demanda química de oxígeno (mg L⁻¹); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L⁻¹); Caudal (m³ día⁻¹).

B (Bullas)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	7.3	7.4	7.4	7.8	6.7	7.5	7.4	7.7	7.4	7.7	6.6	7.1	6.9	10.7	7.6	8.8	7.6	6.4	7.3	7.4	6.9	7.5	8.0	7.4	7.0	7.1
CE	1.6	1.4	1.8	1.5	2.5	2.2	2.6	2.5	3.0	2.4	3.0	2.0	2.4	10.3	2.5	5.5	2.1	5.4	2.2	2.1	1.7	1.5	1.7	1.5	1.8	1.6
FC														3.0		3.0		3.0								
DQO	470	36	514	47	2044	80	745	40	803	52	2225	50	537	8	444	7	1450	5	1583	59	1878	38	299	40	388	45
Cloro														100		175		175								
PAA																										
Caudal	3230		2500		2820		3063			2916			2600		2600		2430		2000		2029		1988		2065	

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

C (Calar de la Santa)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.6	7.8	8.2	7.8			7.9	7.9			7.7	7.6			8.1	8.0			7.2	7.1			7.8	7.7				
CE	1.5	1.6	1.3	1.3			1.6	1.7			1.4	1.6			1.6	1.4			1.2	1.1			1.3	1.2				
FC		0.6		0.5-1.0				0.3-0.5				1.0				1.5												
DQO	391	23	586	104			488	127			1004	67			490	74			215	52			351	68				
Cloro		60		82				90				90				123												
PAA																				5						5		
Caudal		20		20				21				17				18				21						20		

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

D (Cañada de la Cruz)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	7.6	8.0	7.8	7.8			8.1	7.8			7.7	7.8			8.6				7.1	5.7			7.8	5.3				
CE	0.7	0.8	0.8	0.6			0.8	0.8			1.0	1.0			0.8				1.1	0.8			1.9	1.0				
FC		1.0		0.8				1.0				0.9				0.9								0.1				
DQO	102	13	2292	20			296	32			227	26			122				157	123			330	179				
Cloro		68		78				85				83				82												
PAA																				5				5				
Caudal		95		96				98				97				98				74				64				

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

E (Caravaca de la Cruz)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.0	8.0	7.7	7.9	7.8	9.3	7.8	7.9	7.8	7.8	7.5	7.8	8.0	7.5	8.2	8.9	7.6	6.8	7.4	6.2	7.6	3.9	8.0	6.0	8.1	7.7
CE	3.0	1.9	2.2	1.3	2.2	7.2	2.0	1.9	2.3	1.9	2.0	4.0	2.0	1.3	2.8	4.6	2.3	2.0	2.3	2.1	2.3	2.0	2.9	1.7	2.7	2.0
FC		0.2		0.2		0.4		0.2		0.1		0.2		0.3		3.0										
DQO	115	33	2058	37	740	7	568	19	347	23	1035	20	1106	10	997	5	573	33	860	180	819	29	1113	179	187	74
Cloro				24		49		24		20		24		33		40										
PAA																		5		5		5		5		5
Caudal		4479		4420		4180		4313		4050		4060		4065		4172		3921		4110		4150		3842		3894

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm⁻¹); FC: cloro libre (mg L⁻¹); DQO: demanda química de oxígeno (mg L⁻¹); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L⁻¹); Caudal (m³ día⁻¹).

F (Cehegín)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.5	8.6	8.0	8.1	8.0	8.3	8.2	8.1	8.1	8.0	7.6	7.7	6.9	7.4	8.8	8.5	7.7	7.4	7.9	7.4	8.3	8.0	8.1	8.0	7.2	7.3		
CE	1.6	1.3	1.5	1.0	2.8	1.4	1.9	1.3	1.7	1.3	2.0	1.0	2.0	1.3	1.9	1.3	1.5	1.3	2.2	1.3	2.6	1.3	1.3	1.0	1.5	1.1		
FC				0.4		0.6							0.5		3.0													
DQO	513	61	586	52	266	46	507	39	699	45	543	60	561	41	2064	42	593	50	405	35	792	37	822	30	1203	38		
Cloro				77		82							35		180													
PAA																											4	
Caudal		1700		1450		1740		1845		1533			1641		1922		1673		1822		1520		1454		1529			

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

G (El Chaparral)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.2	7.7	8.0	7.8			8.0	7.7			7.6	7.7			7.7	9.5			7.7	7.3			8.2	7.7		
CE	1.1	0.9	1.0	0.9			1.1	1.2			2.0	1.0			1.3	4.5			1.6	1.2			1.6	1.0		
FC		1.7		0.4				3.0								3.0										
DQO	607	29	787	31			452	43			843	34			645	5			896	28			767	84		
Cloro		4		42				161								175										
PAA																				5						5
Caudal		20		19				20								22				20						20

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

H (El Moral)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	6.2	7.7	7.6	7.7			7.6	7.8			7.1	7.4			7.5	9.1			6.5	5.3			6.2	4.9				
CE	2.4	1.4	1.7	1.1			1.8	1.4			2.0	1.0			1.0	4.2			1.6	1.0			1.3	0.8				
FC		1.2		1.0				0.8				0.7				3.0												
DQO		12	2437	32			2475	33			2160	38			6253	3			1747	179			1136	178				
Cloro		95		86				81				85				80												
PAA																				5				5				
Caudal		2.2		0.2				4.3				2.0				2.9				1.6				1.5				

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

I (El Moralejo)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.4	8.4	7.6	7.5			8.5	7.8			7.3	7.4			8.1	8.6			7.3	6.1			7.9	5.7		
CE	2.0	1.9	1.0	0.9			1.9	1.5			2.0	2.0			2.4	3.2			1.7	1.2			1.5	1.0		
FC		0.8		0.7				0.9				1.0				3.0										
DQO	469	12	600	30			615	55			724	13			466	5			761	179			460	178		
Cloro		89		76				83				85				79										
PAA																				5				5		
Caudal		45		54				89				53				63				34				36		

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

J (Los Royos)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	6.7	7.1	6.7	7.9			7.7	7.9			7.3	7.0			7.2	8.5			6.7	5.3			6.6	5.2				
CE	2.1	1.4	1.3	1.1			1.7	1.5			2.0	2.0			2.1	4.4			2.2	1.6			1.9	1.4				
FC		1.1		0.9				0.8				0.8				3.0												
DQO	1282	21	2381	32			1368	40			3471	50			2565	5			1218	178			1285	179				
Cloro		95		83				81				82				80												
PAA																				5				5				
Caudal		0.6		1.1				1.0				1.0				0.9				0.5				0.4				

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

K (Mazuza)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.3	7.9	8.5	7.8			7.9	7.6			8.3	7.7			8.3	7.8			8.5	8.0			8.5	7.6				
CE	1.1	1.5	0.6	1.2			1.0	1.2			1.4	1.8			0.9	1.3			2.0	1.1			0.8	0.8				
FC		0.6		0.5-1.0				0.5				0.5-1.0				1.5												
DQO	309	38	289	78			797	53			403	79			123	62			1253	54			449	29				
Cloro		93		88				75				80				90												
PAA																				5				5				
Caudal		19		14				17				23				30				22				19				

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

L (Moratalla)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF		
pH	8.2	8.4	8.0	8.2	7.1	7.8	8.0	8.1	7.9	7.8	8.0	8.1	8.1	8.1	8.2	8.2	7.8	8.0	7.8	8.0	7.6	7.9	8.2	8.4	8.3	8.1		
CE	1.4	1.5	1.0	1.0	2.5	2.0	2.2	2.2	1.6	1.8	2.0	2.0	1.4	1.7	1.7	1.7	1.4	1.6	2.5	2.2	1.3	1.1	1.6	1.0	2.2	2.0		
FC		0.6		0.1										1.2		1.5												
DQO	203	24	486	26	1206	42	326	29	517	28	840	22	279	34	597	39	1029	41	1979	45	651	34	220	30	858	76		
Cloro		73												55		150												
PAA																												
Caudal	1946	1115	3015	2774	4227	3366	3154	2662					2521	2280	2372	2272	2873	2216	1160	1015	960	631		1895	2040	1665	2496	2156

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm⁻¹); FC: cloro libre (mg L⁻¹); DQO: demanda química de oxígeno (mg L⁻¹); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L⁻¹); Caudal (m³ día⁻¹).

M (Otos)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.4	7.9	8.2	7.8			7.7	7.7			8.5	8.0			8.7	7.7			8.5	8.2			8.8	8.5		
CE	2.1	1.2	0.8	0.8			1.2	1.1			1.6	1.2			1.7	1.2			1.8	1.3			1.5	1.2		
FC																										
DQO	917	55	320	56			279	49			735	42			700	46			935	60			614	43		
Cloro																										
PAA																										
Caudal		17		32				18				20				21				20				22		

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

N (Sabinar)

Parámetros	Fecha muestreo																											
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12			
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	7.8	7.6	7.4	7.5			7.4	7.6			7.5	7.4			7.9	7.7			7.1	7.0			6.7	6.8				
CE	1.1	1.4	1.0	0.9			1.7	1.2			1.1	1.1			1.1	1.0			1.1	1.0			1.0	0.9				
FC	0.1	0.6		0.5-1.0				0.5-1.0				0.5-1.0				1.5												
DQO	239	15	615	24			316	25			2299	20			128	22			402	27			406	23				
Cloro		86		90				80				80				145												
PAA																				5						5		
Caudal		81	63	58			73	74			80	71			81	73			69	64			109	125				

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm⁻¹); FC: cloro libre (mg L⁻¹); DQO: demanda química de oxígeno (mg L⁻¹); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L⁻¹); Caudal (m³ día⁻¹).

O (Valentín)

Parámetros	Fecha muestreo																									
	23/6		7/7		21/7		4/8		25/8		8/9		22/9		6/10		20/10		3/11		17/11		1/12		15/12	
	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF	IN	EF
pH	8.4	8.5	7.9	7.6			7.8	7.6			7.6	8.0			7.4	7.8			7.7	7.2			7.8	7.4		
CE	1.4	1.1	1.0	0.9			1.3	1.2			2.0	1.0			1.5	1.5			2.6	1.4			2.0	1.5		
FC		0.5		0.3				0.5				0.2				1.5										
DQO	716	37	385	39			457	31			512	25			678	45			697	48			541	33		
Cloro		120		120				96								120										
PAA																				5						5
Caudal		80		84				89								83				84						86

IN: influente; EF: efluente; CE: conductividad eléctrica (mS cm^{-1}); FC: cloro libre (mg L^{-1}); DQO: demanda química de oxígeno (mg L^{-1}); cloro: dosis de cloro añadida; PAA: dosis de ácido peracético añadida (mg L^{-1}); Caudal ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$).

2.2. Impacto de las metodologías de inactivación microbiana en el análisis de los DBPs

Los resultados mostraron que las muestras de efluente sometidas a los protocolos de inactivación microbiana redujeron el contenido de THM4 (**Tabla 7.3**). Incluso antes de la adición del reactivo de inactivación, el pretratamiento de las muestras mediante centrifugación y filtración mostró una reducción media en la concentración de THM4 de un 36%. Esta reducción fue aún más acusada cuando se adicionaron los reactivos de inactivación: fenol e isotiocianato de guanidina (tampón de lisis) y paraformaldehído (PFA). En concreto, la adición del tampón de lisis redujo el contenido en THM4 en un 46%. Sin embargo, el proceso de inactivación que causó la mayor pérdida de THM4 fue el protocolo basado en la adición de PFA, alcanzando una pérdida media de THM4 de un 85% (**Tabla 7.3**). En cuanto a los THMs individuales, las pérdidas tras los protocolos de inactivación fueron particularmente relevantes para el cloroformo (triclorometano, TCM), como el principal THM, el cual se redujo entre un 22-50% tras los procesos de centrifugación y filtración. Asimismo, la concentración de TCM se redujo entre un 29-62% tras la adición del tampón de lisis, y las reducciones alcanzaron un 62-100% tras la adición de PFA (datos no mostrados). En cuanto a los HAA9, el impacto del proceso de inactivación no siguió una tendencia cuando se procedió a la cuantificación de estos compuestos. En las EDARs con una alta concentración de HAAs (EDAR-L), la concentración de estos subproductos se mantuvo relativamente estable tras el pretratamiento de las muestras y los posteriores procesos de inactivación, tanto con la aplicación del tampón de lisis como del PFA. Sin embargo, en las EDARs con una baja concentración de HAAs (EDAR-K y N), se observaron ligeras pérdidas, aunque éstas no fueron cuantitativamente significativas. Únicamente en las EDARs donde la concentración de HAAs fue cercana al LoQ, las pérdidas debidas a los procesos de

inactivación fueron evidentes (EDAR-B y F). De esta manera no se pudo garantizar que se pudieran obtener resultados fiables en la cuantificación de estos subproductos tras la inactivación de las muestras, especialmente a concentraciones cercanas al LoQ (**Tabla 7.3**). Por último, en cuanto a clorato, las concentraciones calculadas en los efluentes inactivados fueron similares a aquellas cuantificadas en los no inactivados, evidenciando que ninguno de los protocolos de inactivación afectó a la detección y cuantificación de estos DBPs (**Tabla 7.3**). El método basado en la adición de fenol e isotiocianato de guanidina descrito para el SARS-CoV-2 (método de tampón de lisis) resultó el más rápido y sencillo de las dos estudiados, por lo que fue el elegido para su utilización durante los muestreos de las distintas aguas residuales. Asimismo, debido a que los niveles de clorato no se vieron afectados por el tratamiento de inactivación, este subproducto inorgánico pudo ser analizado tanto en los influentes de entrada a la depuradora como en los efluentes tras los tratamientos de desinfección aplicados, así como en la EDAR cuyo tratamiento se basó en la utilización de un biofiltro electroactivo (EDAR-M). Sin embargo, debido a que el protocolo de inactivación afectó a la estabilidad de los THMs y HAAs, su presencia únicamente se pudo monitorizar en los efluentes de las distintas EDARs, no pudiendo ser cuantificados estos subproductos en los influentes ni en el efluente de las aguas tratadas procedentes de la EDAR-M, ya que estaba en experimentación y no se había validado la efectividad microbiológica.

Tabla 7.3. Cambios en el contenido de THM4, HAA9 y clorato en las muestras de efluente de 5 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) sometidas o no a un proceso de inactivación microbiana.

EDARs	Tecnología de desinfección	Metodología de inactivación	THM4	HAA9	Clorato
B	UV	No	0.8±0.1	1.4±0.6	**
		C+F	0.5±0.1	*	**
		Tampón de lisis	0.4±0.1	*	**
		PFA	0.1±0.0	*	**
F	PAA/UV	No	0.8±0.1	1.1±0.3	**
		C+F	0.4±0.1	*	**
		Tampón de lisis	0.3±0.0	*	**
		PFA	*	*	**
K	PAA	No	2.2±0.3	14.0±0.2	**
		C+F	1.4±0.2	13.0±6.3	**
		Tampón de lisis	0.9±0.1	11.9±3.0	**
		PFA	0.2±0.1	8.6±0.7	**
L	Cloro/UV	No	2337.2±103.8	761.8±7.7	3.1±0.1
		C+F	1806.7±147.9	822.7±16.4	3.1±0.1
		Tampón de lisis	1638.9±57.4	778.9±6.2	3.2±0.0
		PFA	370.0±45.8	780.8±33.4	3.4±0.1
N	Cloro	No	56.5±1.1	24.4±2.1	1.6±0.0
		C+F	38.1±1.8	17.0±1.3	1.6±0.0
		Tampón de lisis	39.4±4.1	20.2±1.2	1.6±0.0
		PFA	19.6±2.8	20.5±1.4	1.8±0.1

Los valores están expresados como el promedio ± desviación estándar tres réplicas. * < LoQ (límite de cuantificación). ** < 0.05 mg L⁻¹, en el caso de clorato. No: sin inactivación; C+F: centrifugación y filtración; PFA: paraformaldehído.

2.3. Presencia de clorato en los influentes de las EDARs

Tal y como se ha comentado anteriormente, clorato fue el único DBP analizado en los influentes de las 15 EDARs estudiadas, tras la inactivación de las muestras con el protocolo anteriormente indicado. En relación a esto, se detectaron niveles de clorato en los influentes de casi todas las EDARs muestreadas, excepto en EDAR-H y L las cuales

mostraron niveles de clorato extremadamente bajos en algunos muestreos puntuales (**Figura 7.1**). En cuanto al resto de las EDARs, aunque en la mayoría de los casos este subproducto inorgánico estuvo por debajo de los límites máximos establecidos tanto por la UE como por la OMS para agua potable (0.7 mg L^{-1}), estos límites fueron superados puntualmente en varias de ellas (EDAR-A, B, I y K) (OMS, 2017; UE, 2020a). También se observó que estos niveles fueron muy elevados y con una gran variabilidad en alguna de las depuradoras (EDAR-I), superando puntualmente el límite máximo residual hasta 40 veces.

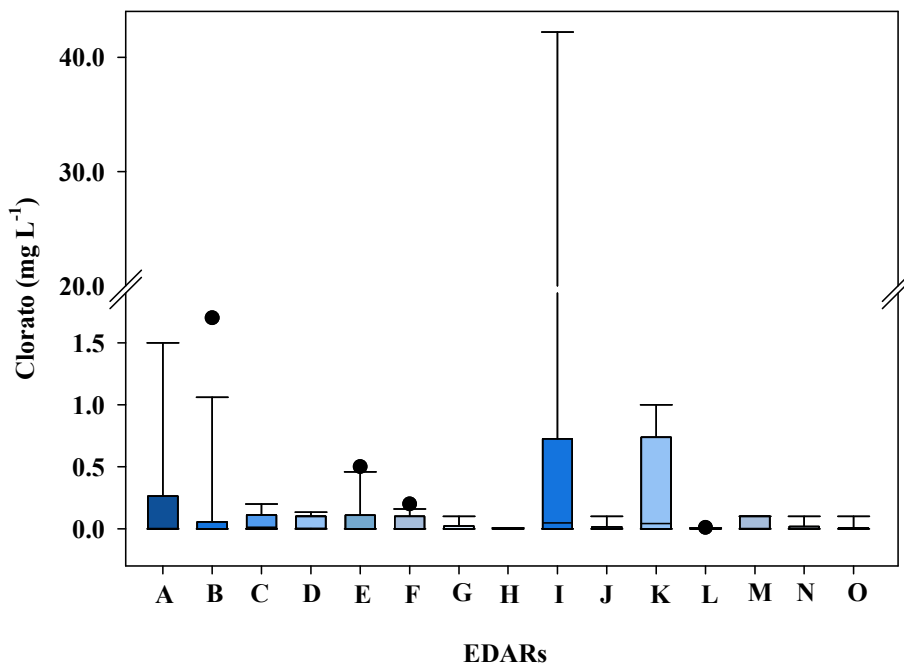


Figura 7.1. Niveles de clorato en las muestras de influente de entrada a la depuradora en las 15 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Ver **Tabla 7.1** para identificación de la EDARs.

2.4. Presencia de DBPs en los efluentes de las EDARs atendiendo a la tecnología de desinfección utilizada

Para este estudio se evaluaron 15 EDARs, las cuales utilizaron uno de los tres tratamientos de desinfección (cloro, PAA, UV) o sus combinaciones (cloro/UV, PAA/UV), además de una EDAR que utilizó un biofiltro electroactivo. Los resultados obtenidos durante todo el período de muestreo para los distintos DBPs (TMHs, HAAs y clorato) en los efluentes analizados se agruparon atendiendo a cada una de las tecnologías de tratamiento o desinfección utilizadas. El test de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) mostró que el conjunto de datos no siguió una distribución normal, probablemente debido a las diferencias en el número de muestras tratadas con las distintas tecnologías de desinfección. Por este motivo se aplicaron pruebas no paramétricas para el tratamiento de datos, utilizando el test de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) para la comparación de las tecnologías de tratamiento y desinfección utilizadas y, en aquellos casos donde se mostraron diferencias significativas, se aplicó un test de Mann Withney ($p < 0.05$), para comparar cada tecnología de desinfección con la que utilizaba cloro.

En cuanto al contenido en THM4, los resultados mostraron diferencias significativas en estos DBPs cuando la desinfección con cloro se comparó con el resto de tecnologías, excepto cuando se comparó con cloro/UV (**Figura 7.2**). La máxima concentración de THM4 se detectó cuando se utilizó la combinación cloro/UV, mostrando esta tecnología de desinfección una mediana de $300 \mu\text{g L}^{-1}$, en comparación con la desinfección únicamente con cloro, que mostró una mediana de $46 \mu\text{g L}^{-1}$ para THM4 (**Figura 7.2**). Puntualmente, en dos de los muestreos analizados, los efluentes tratados con PAA mostraron valores de THM4 inusualmente elevados (230 y $521 \mu\text{g L}^{-1}$). Sin embargo, tal y como era de esperar, los niveles de THM4 en los efluentes tratados con PAA y UV, o la combinación de ambos, presentaron valores considerablemente

bajos, e incluso por debajo del LoQ, en muchos de los casos. Asimismo, en cuanto a los niveles de THMs individuales, triclorometano (TCM) fue el más abundante, representando más del 85% de la concentración de los THMs cuantificados, seguido de bromodiclorometano (BDCM), clorodibromometano (CDBM) y tribromometano (TBM), representando este último la concentración más baja (**Figura 7.3**).

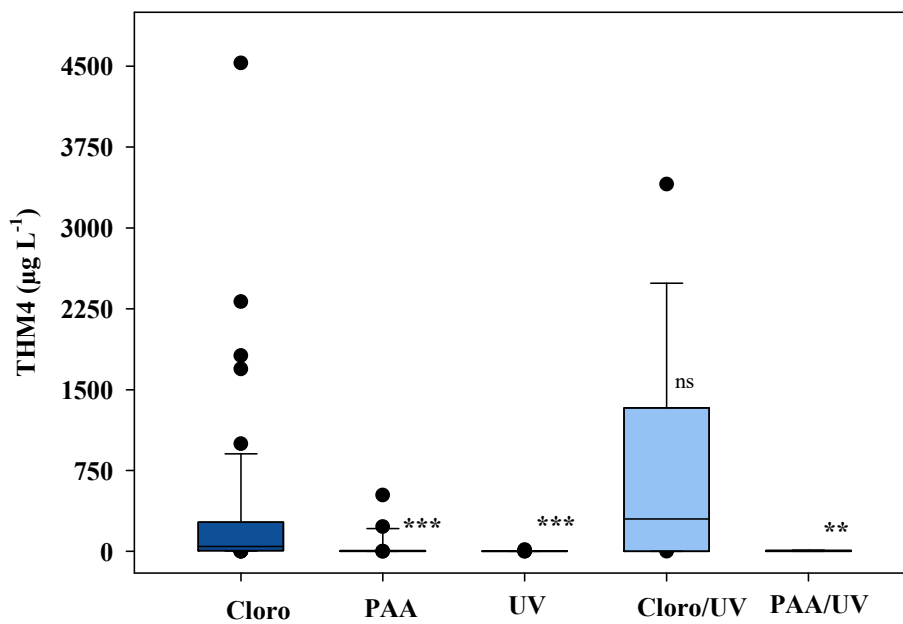


Figura 7.2. Cambio en los niveles de THM4 en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

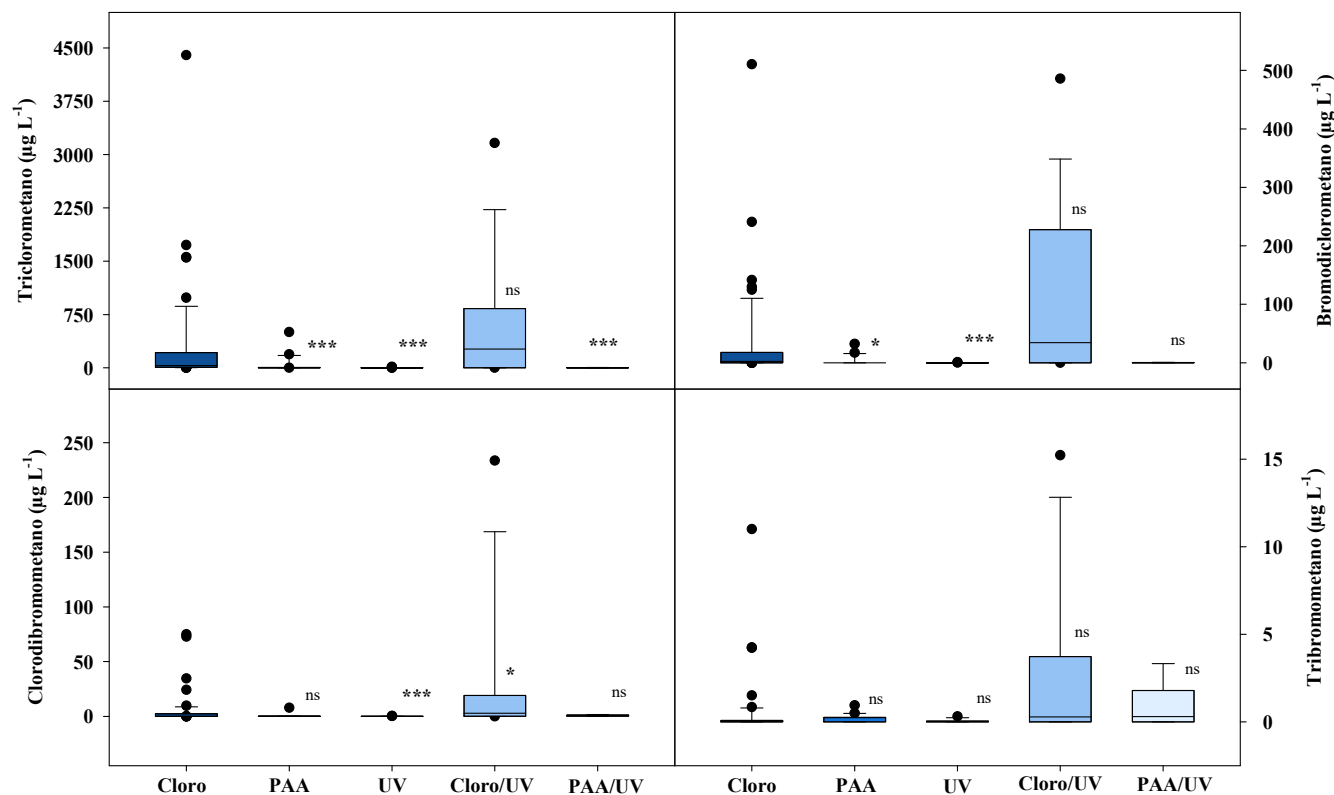


Figura 7.3. Cambio en los niveles de THMs individuales (triclorometano, bromodibromometano, clorodibromometano y tribromometano) en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Asimismo, la concentración de HAA9 presentó una tendencia similar a la de THM4, con concentraciones significativamente más elevadas en los tratamientos de desinfección con cloro y cloro/UV, en comparación con las otras tecnologías de desinfección estudiadas. La máxima concentración de HAA9 también se observó con el tratamiento combinado cloro/UV, mostrando una mediana de $181 \mu\text{g L}^{-1}$, en comparación con la desinfección con cloro (mediana de $87 \mu\text{g L}^{-1}$ para HAA9) (**Figura 7.4**). Igualmente, es necesario destacar que la formación de HAA9 con la utilización de cloro/UV mostró una gran variación, con valores entre 34.6 y $2583.9 \mu\text{g L}^{-1}$ para los percentiles 25 y 75, respectivamente (**Figura 7.4**). Asimismo, los resultados muestran diferencias significativas en el contenido de HAA9 entre la utilización de cloro y los tratamientos con PAA o UV. Sin embargo, puntualmente y al igual que ocurrió con el contenido en THM4, los efluentes tratados con PAA, UV y PAA/UV también mostraron valores elevados para HAA9 en algunos de los muestreos (99.1 , 66.8 y $94.8 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) (**Figura 7.4**).

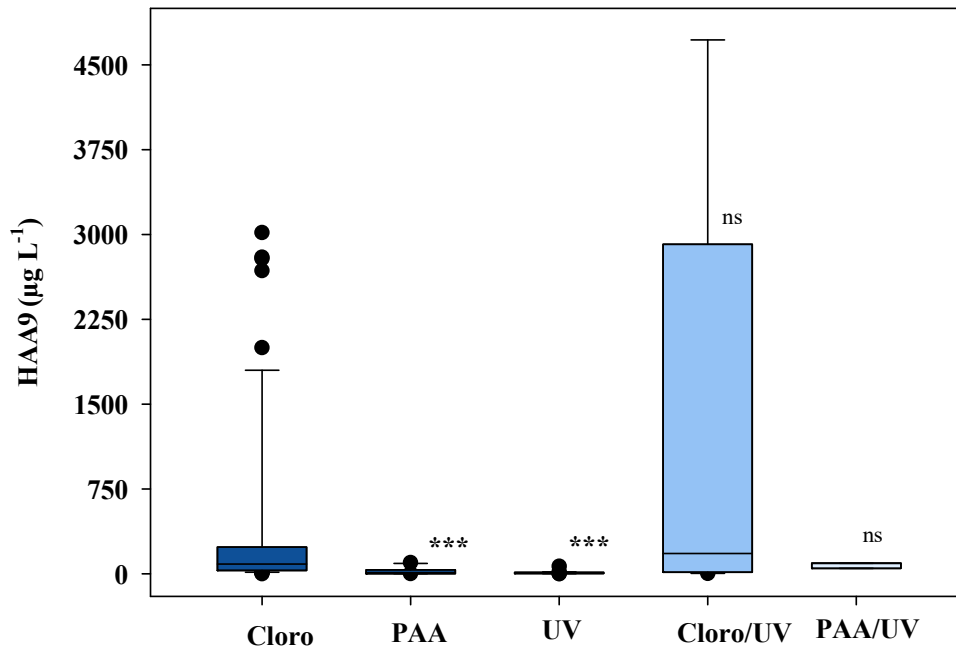


Figura 7.4. Cambio en los niveles de HAA9 en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV y PAA/UV, de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

Asimismo, cuando se determinó el contenido en clorato, se observó que este DBP inorgánico fue relativamente elevado en los efluentes tratados con cloro y con cloro/UV, con medianas de 3.9 y 5.8 mg L⁻¹ y valores atípicos de 258.9 y 283.9 mg L⁻¹, respectivamente (**Figura 7.5**). Asimismo, tal y como se esperaba, en las aguas tratadas con el resto de tecnologías de desinfección, los niveles de clorato fueron significativamente inferiores ($p < 0.001$), con niveles mínimos en los tratamientos con PAA, UV y PAA/UV. Asimismo, los residuos de clorato también fueron analizados en

los efluentes cuyo tratamiento consistió en un biofiltro electroactivo (EDAR-M), ya que estas aguas pudieron someterse al proceso de inactivación microbiana previo al análisis de estos subproductos. Los resultados mostraron que en estos efluentes los residuos de clorato fueron muy bajos y significativamente diferentes a los tratamientos clorados (Figura 7.5).

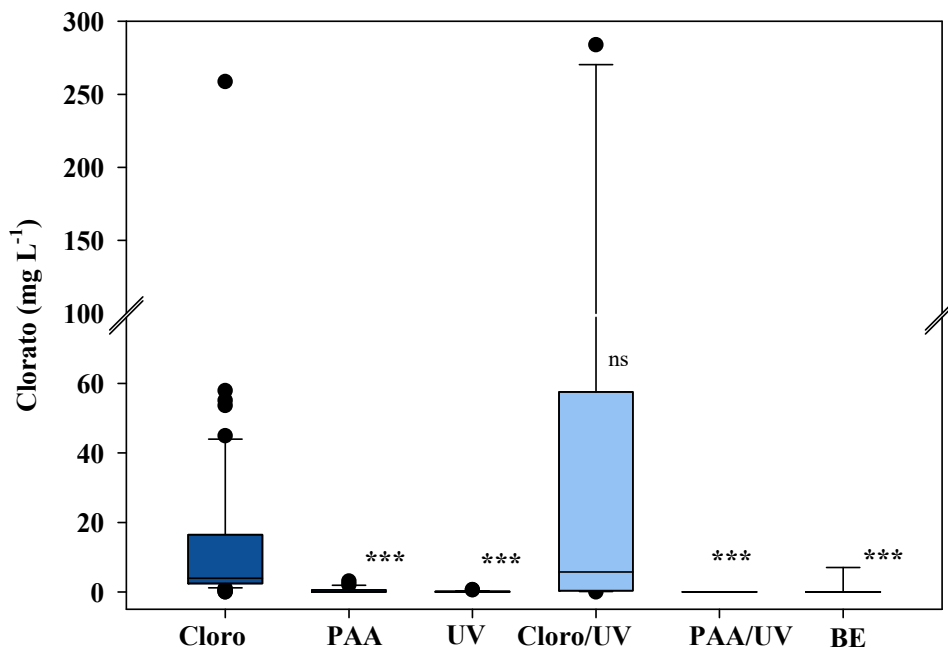


Figura 7.5. Cambio en los niveles de clorato en las muestras de efluente de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) agrupadas por tecnologías de desinfección. La línea horizontal del diagrama de caja representa el valor de la mediana y los márgenes inferior y superior de la caja muestran los percentiles 25 y 75, respectivamente. Los extremos inferior y superior de los bigotes muestran los percentiles 10 y 90, respectivamente, calculados según el método Cleveland. Los símbolos (●) representan valores atípicos. Los asteriscos indican diferencias significativas cuando se compara el cloro con los tratamientos con ácido peracético (PAA), radiación ultravioleta (UV), cloro/UV, PAA/UV y biofiltro electroactivo (BE), de acuerdo con el test de Mann Withney: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo).

2.5. Monitorización de los efluentes de las EDARs a lo largo de los muestreos periódicos para la determinación de la formación de los DBPs

La monitorización en las distintas depuradoras se realizó dos veces al mes en las 4 EDARs de mayor tamaño y una vez al mes en las 11 EDARs de menor tamaño, donde su concentración fluctuó considerablemente a lo largo de los siete meses de muestreo, principalmente en función del tratamiento de desinfección aplicado. Seguidamente, se muestran los resultados para cada uno de los DBPs (THMs, HAAs y clorato) en los efluentes de las distintas EDARs, a lo largo del período de muestreo. En primer lugar, se muestra su monitorización con más detalle en dos de las depuradoras elegidas como representativas, debido a su mayor tamaño y número de muestreos y donde se utilizaron distintas tecnologías de desinfección cloradas y no cloradas (EDAR-B y E). Seguidamente, se muestra la monitorización de los DBPs para el resto de las EDARs.

En cuanto al contenido en THM₄, los resultados mostraron que la generación de estos DBPs se redujo considerablemente cuando se cambió el tratamiento de desinfección empleado. En particular, cuando los tratamientos con UV, PAA o la combinación de ambos, sustituyeron a la desinfección con cloro o cloro/UV, los niveles de THMs se redujeron hasta concentraciones extremadamente bajas, reduciendo estos DBPs por debajo del límite máximo establecido para agua potable por la UE (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) o por la USEPA (80 $\mu\text{g L}^{-1}$) (USEPA, 1998; 2006, UE, 2020a) e incluso alcanzando en algunos casos niveles cercanos o por debajo del LoQ (**Figuras 7.6 y 7.7**). Si bien es cierto que en algunos de los muestreos donde se utilizaron tratamientos clorados de desinfección se observaron niveles bajos de THM₄, probablemente relacionado con la menor dosificación o el tipo y/o concentración de materia orgánica presente en las aguas tratadas. Asimismo, en cuanto a los THMs individuales, los resultados mostraron que la variación de TCM, como THM principal y más abundante, siguió el mismo patrón que la suma de THM₄,

mostrando concentraciones ampliamente superiores en los efluentes clorados. Un comportamiento similar se observó para BDCM y CDBM, ya que cuando el cloro fue utilizado como tratamiento de desinfección se observó una mayor concentración de estos THMs, aunque en menor medida debido a la menor proporción de éstos en la suma total de THMs (**Figura 7.6**). Esta tendencia se confirma en los resultados de todas las EDARs cuyos efluentes son tratados con cloro o cloro/UV (**Figura 7.7**). Sin embargo, los resultados también mostraron que cuando se compararon las distintas EDARs que utilizaron tratamientos clorados de desinfección (cloro o cloro/UV), la mayor acumulación de THM4 en cada una de ellas varió con niveles máximos tan bajos como $120 \mu\text{g L}^{-1}$ en EDAR-K o tan elevados como $4530 \mu\text{g L}^{-1}$ en EDAR-H (**Figura 7.7**). Estos resultados pusieron en evidencia que, aunque se demostró una clara relación entre la desinfección con cloro y cloro/UV y el considerable aumento de THMs en los efluentes muestreados, la mayor o menor formación de estos subproductos también puede depender de otras características de las aguas tratadas, tales como la dosis de desinfectante añadido o la concentración residual del mismo, el pH, o el contenido y tipo de materia orgánica (**Tabla 7.2**).

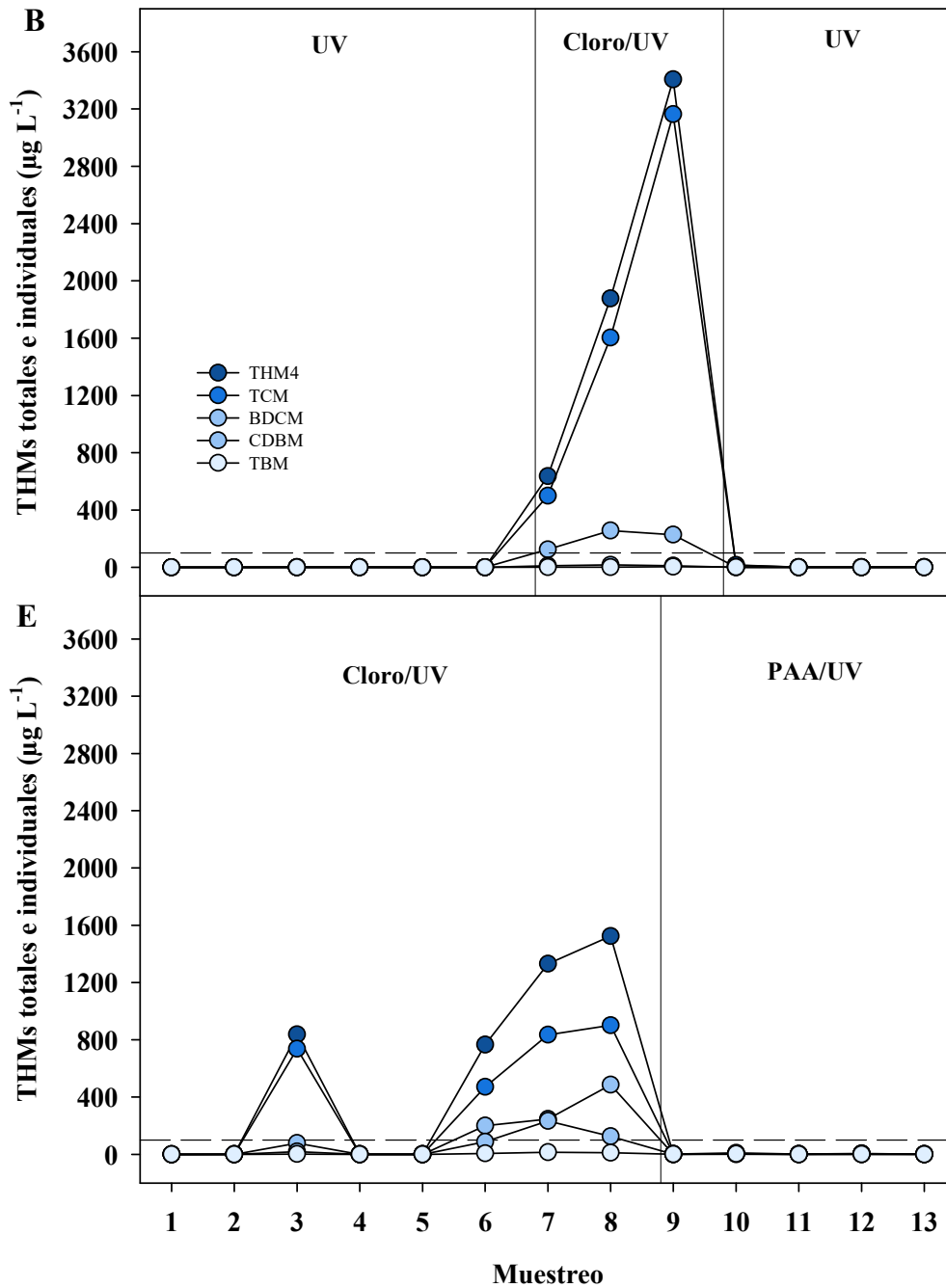


Figura 7.6. Trihalometanos totales (THM4) e individuales a lo largo de los 13 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea para agua potable. Triclorometano (TCM), bromodichlorometano (BDCM), clorodibromometano (CDBM) y tribromometano (TBM). Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

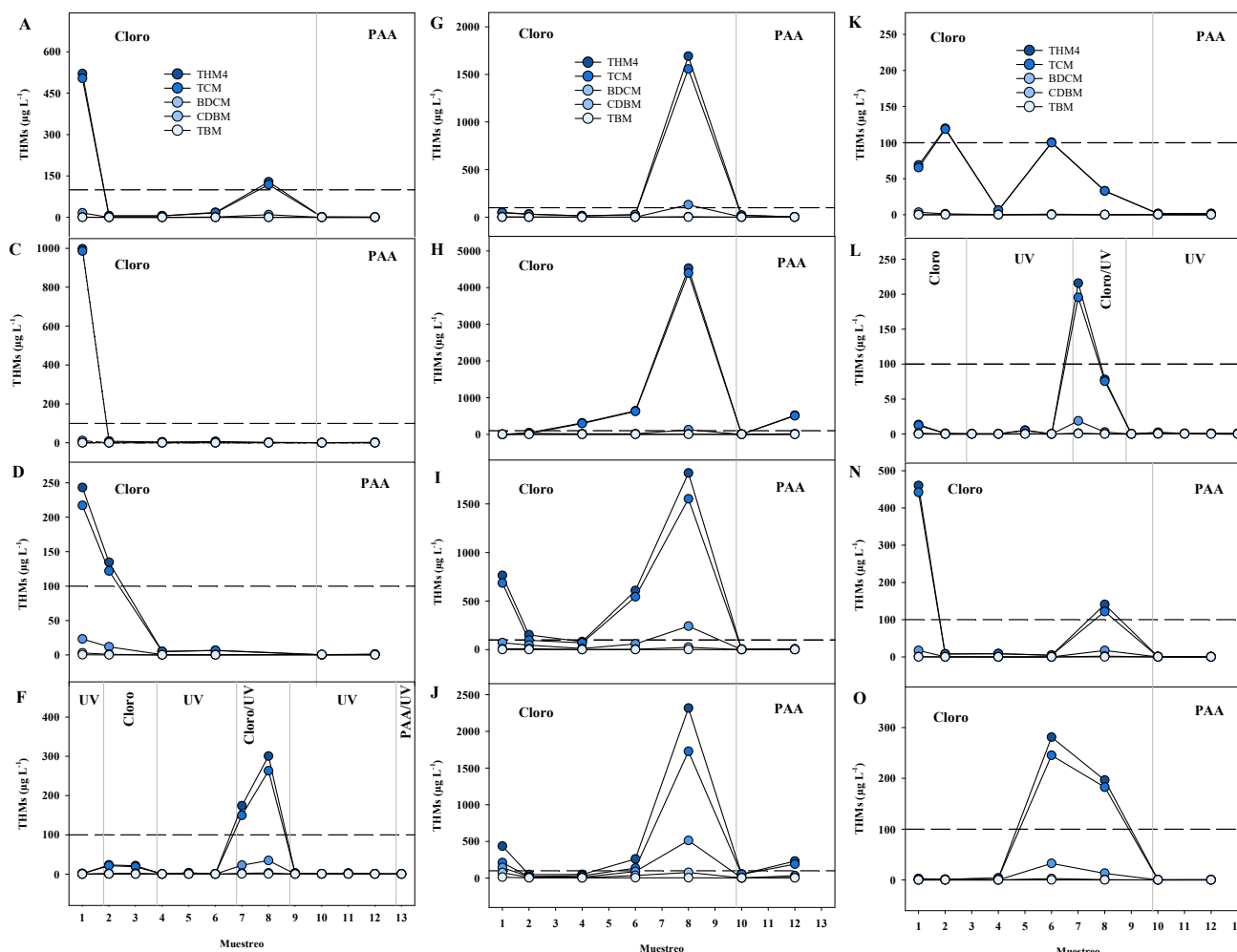


Figura 7.7. Trihalometanos totales (THM4) e individuales a lo largo de los 13 muestreos en 12 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Unión Europea para agua potable. Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

En cuanto a la formación de HAAs, cuando se monitorizaron los efluentes de las distintas EDARs se observó una tendencia similar a la descrita para THM4. Los resultados mostraron que la formación de HAA9 aumentó cuando el tratamiento de desinfección utilizó cloro o cloro/UV (**Figura 7.8**). En relación a esto, los niveles de HAA9 aumentaron marcadamente en los efluentes clorados, alcanzando concentraciones de hasta $2600 \mu\text{g L}^{-1}$ en las EDAR-C, G, H y J (**Figura 7.9**). Asimismo, resulta destacable la elevada acumulación de HAA9 mostrada en la EDAR-E, alcanzando una concentración de $6300 \mu\text{g L}^{-1}$, excediendo ampliamente el nivel máximo de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la UE y la USEPA para agua potable (USEPA, 1998; 2006, UE, 2020a) (**Figura 7.8**). En cuanto a la monitorización de los HAAs individuales, se detectaron ácido dicloroacético (DCAA) y ácido tricloroacético (TCAA) en todas las muestras tratadas con cloro y cloro/UV, mostrando las EDAR-B, C y E los mayores niveles para estos HAAs. Asimismo, los niveles de ácido monocloroacético (MCAA) y ácido dibromoacético (DBAA) siguieron la misma tendencia que HAA9, siendo estos dos HAAs el segundo grupo que más contribuyó a la suma total de HAA9. Por el contrario, ácido monobromoacético (MBAA), ácido bromocloroacético (BCAA), ácido bromodicloroacético (BDCAA), ácido clorodibromoacético (CDBAA) y ácido tribromoacético (TBAA) fueron, excepto para algunos muestreos, los HAAs detectados en menor proporción (datos no mostrados). Asimismo, es necesario destacar que, cuando las aguas fueron tratadas con PAA, UV o su combinación, los niveles de HAAs disminuyeron a valores por debajo del límite establecido para agua potable e incluso alcanzando niveles cercanos o por debajo a los LoQ.

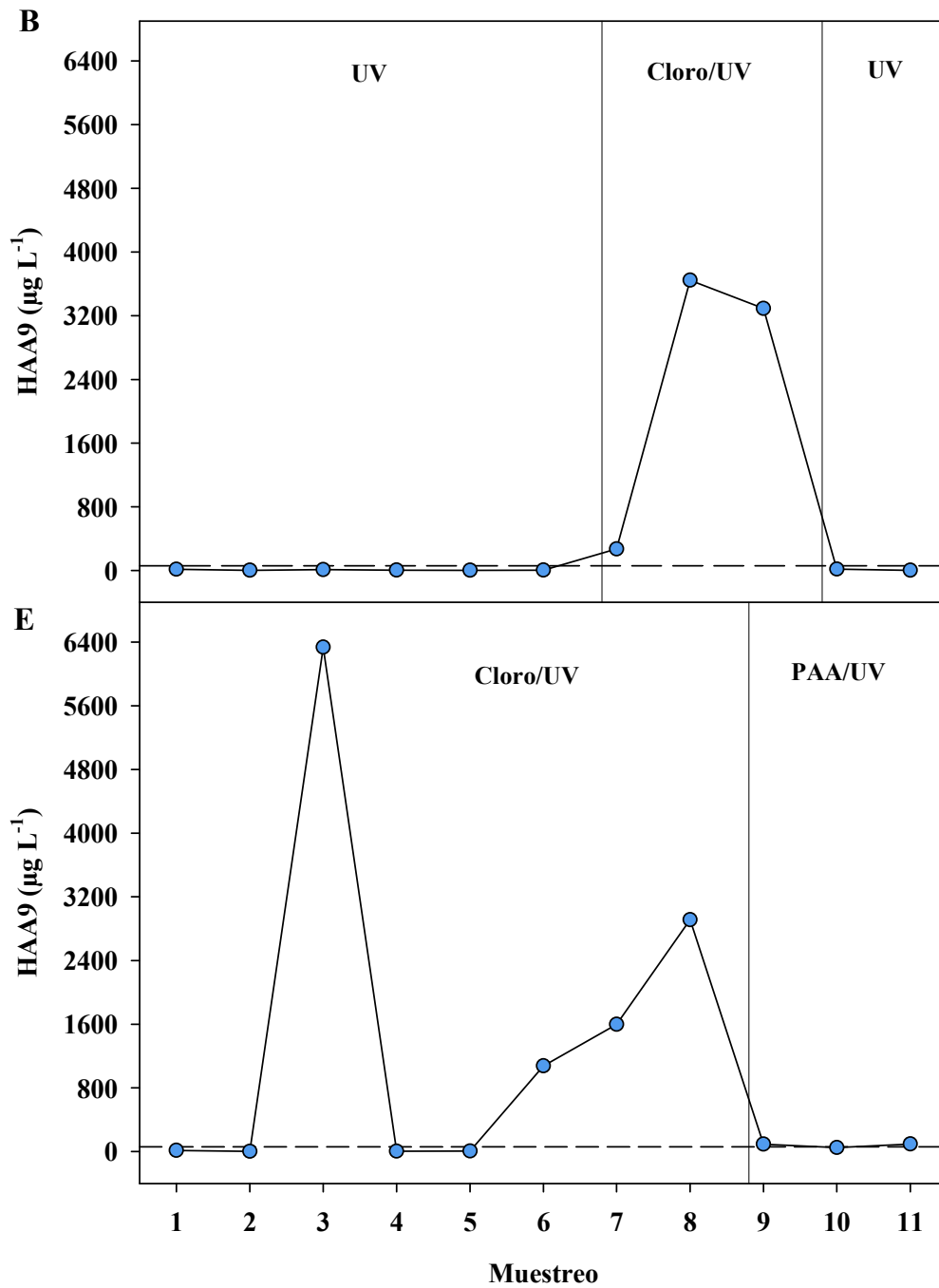


Figura 7.8. Contenido en HAA9 a lo largo de los 11 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 60 µg L⁻¹ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable. Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

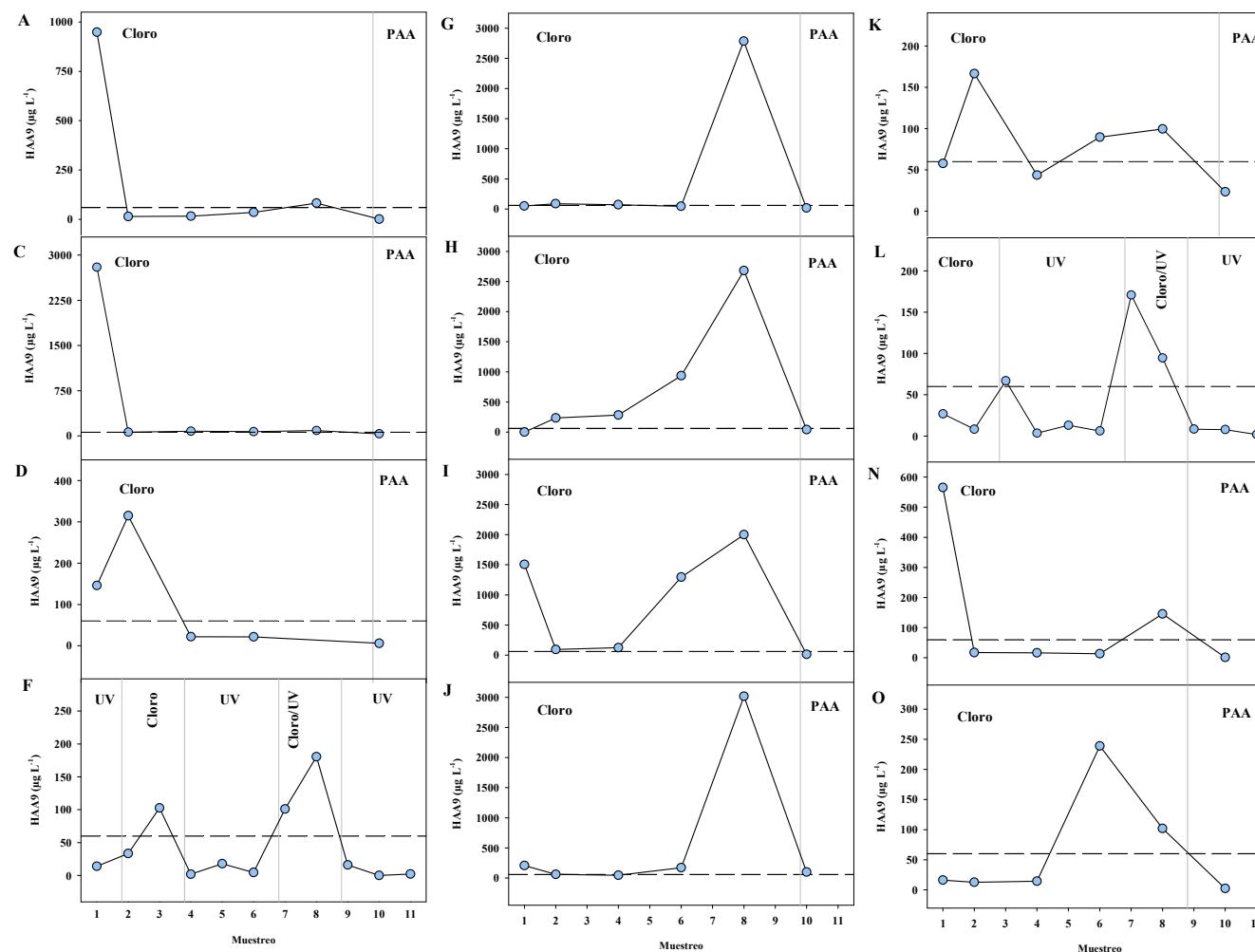


Figura 7.9. Contenido en HAA9 a lo largo de los 11 muestreos en 12 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs), donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 60 µg L⁻¹ establecido por la Unión Europea y la USEPA para agua potable. Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

En cuanto a los niveles de clorato, las concentraciones más bajas para este DBP fueron también detectadas en los efluentes con tratamientos no clorados (PAA, UV, PAA/UV), en contraposición con los mayores niveles cuantificados en aquellas EDARs que emplearon la desinfección con cloro y cloro/UV (**Figura 7.10**). Las EDARs-B, E y G fueron las que presentaron mayores concentraciones de clorato en algunos de los muestreos, con niveles superiores a 250 mg L^{-1} , excediendo ampliamente el límite máximo para agua potable de 0.7 mg L^{-1} establecido por la UE (UE, 2020a), debido a los tratamientos con cloro solo o combinado con UV (**Figuras 7.10 y 7.11**). Asimismo, tal y como era de esperar, excepto en el primer punto de muestreo, no se detectaron niveles de clorato en el efluente de la EDAR-M, siendo ésta la única depuradora que no utilizó un sistema de desinfección basado en agentes químicos (**Figura 7.11**). Por último, destacar que, al final del estudio, el tratamiento de desinfección con cloro y cloro/UV fue sustituido por PAA, UV, o su combinación, en todas aquellas EDARs que lo empleaban, alcanzando una reducción muy significativa de los DBPs.

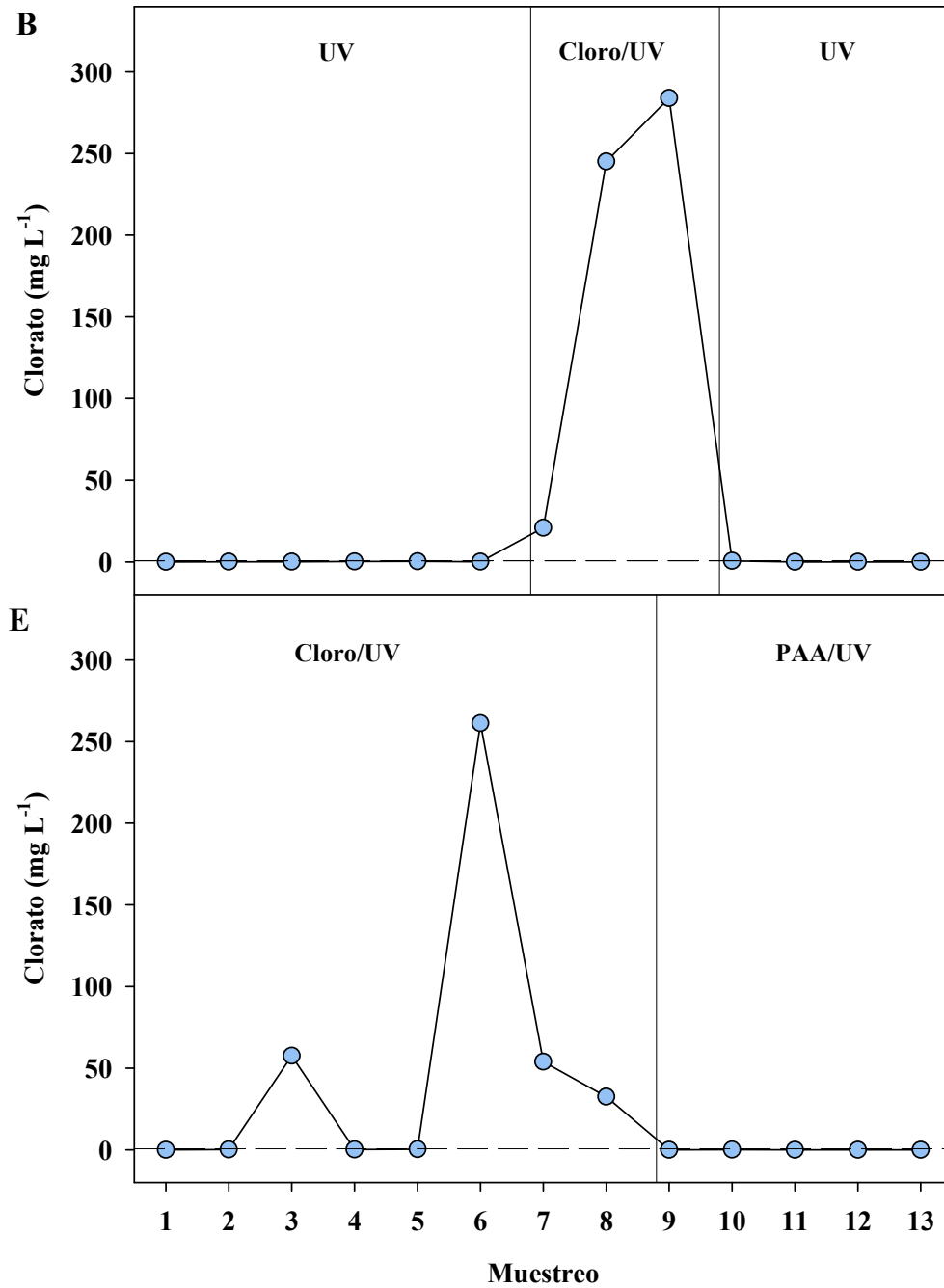


Figura 7.10. Contenido en clorato a lo largo de 13 muestreos en la EDAR-B y E, donde las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7 mg L⁻¹ establecido por la Unión Europea para agua potable. Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

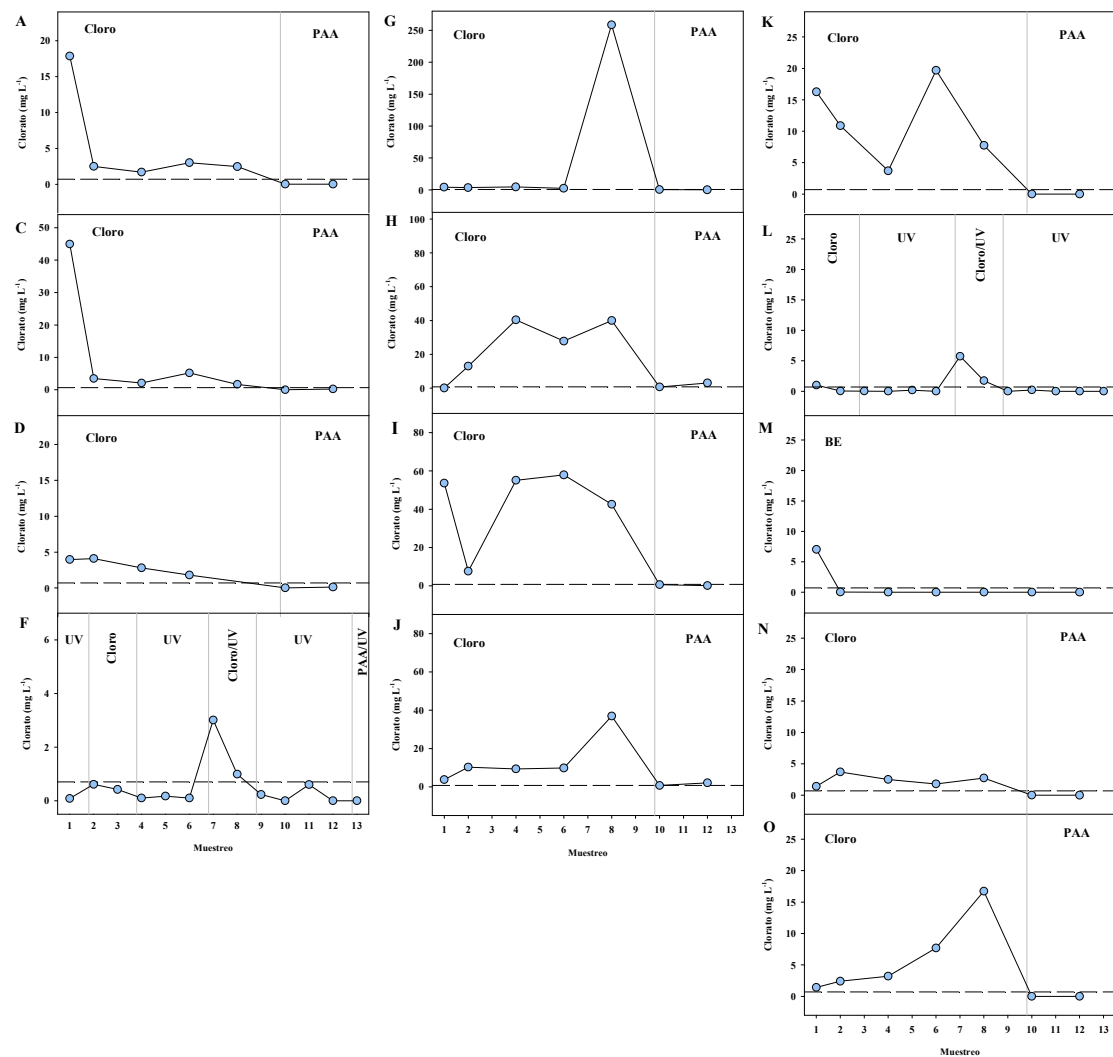


Figura 7.11. Contenido en clorato a lo largo de 13 muestreos en 13 Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs). Las líneas verticales separan las tecnologías de desinfección. La línea discontinua muestra el límite máximo de 0.7 mg L⁻¹ establecido por la Unión Europea para agua potable. Ver **Tabla 7.1** para identificación de las EDARs.

3. DISCUSIÓN

La utilización de aguas regeneradas para el riego agrícola constituye una de las fuentes de agua no convencionales más utilizadas en zonas con alto estrés hídrico, donde la demanda de agua para la agricultura supera ampliamente a los recursos hídricos disponibles. Murcia y la Comunidad Valenciana son dos de las principales regiones donde se lleva a cabo el tratamiento y la reutilización de las aguas residuales urbanas destinadas para el riego. Asimismo, durante el tratamiento terciario de estas aguas residuales, resulta imprescindible la selección de tecnologías de desinfección adecuadas, de manera que se mantenga la seguridad microbiológica atendiendo a la legislación vigente, pero también evitando el riesgo químico derivado de la posible formación de DBPs en los efluentes tratados, así como su acumulación en los cultivos regados con estas aguas regeneradas (EFSA, 2015; López-Gálvez y col., 2018; EC, 2017, 2020b; Cui y col., 2020; Bernstein y col., 2021; Truchado y col., 2021b; Sharma y col., 2021). En este sentido, los tratamientos de desinfección con cloro han sido ampliamente empleados en las plantas de tratamiento (Li y col., 2017b, 2017c). En el estudio llevado a cabo, se ha realizado el análisis de los principales DBPs orgánicos regulados (THMs y HAAs) generados durante el tratamiento terciario de 15 EDARs, así como de clorato como principal DBP inorgánico. Para ello, se realizaron muestreos durante 13 semanas consecutivas entre los meses de junio a diciembre, con la intención de profundizar en aquellos tratamientos de desinfección que pudieran prevenir la acumulación de DBPs en las aguas regeneradas y destinadas para su utilización en el riego agrícola. Las aguas residuales muestreadas procedían de distintas EDARs situadas en áreas urbanas de distintos tamaños y en las que se emplearon diversas tecnologías de desinfección (cloro, PAA, UV, y sus combinaciones cloro/UV, PAA/UV). Asimismo, en una de las EDARs estudiadas las aguas residuales se trataron empleando una tecnología consistente en un biofiltro electroactivo.

En primer lugar, con la finalidad de evitar cualquier riesgo microbiológico derivado de la posible presencia del virus SARS-CoV-2 en los influentes de las aguas muestreadas, se estudió la aplicación de un protocolo de inactivación microbiana previo al análisis de los DBPs y su efecto en la degradación de los mismos, ya que se desconocían las posibles interferencias para su cuantificación. Se ha descrito la presencia del virus SARS-CoV-2 en aguas residuales (Randazzo y col., 2020; Kataki y col., 2021), por lo que, para la manipulación segura de las muestras, se procedió al estudio comparativo de distintos protocolos de inactivación. Darnell y col. (2004), examinaron distintos métodos de inactivación para el virus SARS-CoV-2, destacando tratamientos basados en la aplicación de radiación UV o radiación gamma, la aplicación de calor, métodos basados en el ajuste de pH, o protocolos basados en la adición de formaldehído y glutaraldehído o fenol e isotiocianato de guanidina. En relación a esto, se seleccionaron dos protocolos de inactivación, teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los subproductos a determinar (THMs, HAAs y clorato), así como la naturaleza de la matriz estudiada. Uno de ellos basado en la adición de fenol e isotiocianato de guanidina como tampón de lisis, y el otro basado en la aplicación de paraformaldehído. Los resultados mostraron que ambas metodologías redujeron las concentraciones de THM4 y HAA9 en las muestras examinadas. Aunque no se conoce con exactitud las causas de las interferencias encontradas, en cuanto a los THMs, su naturaleza altamente volátil pudo contribuir en las interferencias observadas en la cuantificación de estos compuestos, derivadas de la aplicación de ambos métodos de inactivación (Kali y col., 2021). Se observó una reducción en la concentración de THMs tras los pasos de centrifugación y filtración, siendo esta reducción aún más acusada cuando se adicionaron los reactivos para la inactivación (tampón de lisis y paraformaldehído). En cuanto a los HAAs, aunque el impacto del proceso de inactivación no mostró una tendencia clara, sí se observaron

ligeras pérdidas en concentraciones medias y cercanas al LoQ. En este sentido, y aunque se desconocen las causas concretas del efecto matriz observado, las características físico-químicas de estos subproductos tales como la dificultad de ionización de los ácidos monohaloacéticos debido a su relativamente alto valor de pKa o la baja respuesta del TBAA debido a la inestabilidad de este compuesto (Planas y col., 2019) les confiere una inherente dificultad para su análisis por UHPLC-ESI-QqQ. Como consecuencia, ligeros cambios en la matriz de análisis podrían repercutir negativamente en la cuantificación de estos compuestos. Asimismo, debido a que el protocolo de inactivación afectó a la estabilidad de los THMs y HAAs, su presencia únicamente se pudo monitorizar en los efluentes de las distintas EDARs. En cambio, debido a que los niveles de clorato no se vieron afectados por el tratamiento de inactivación, este subproducto inorgánico pudo ser analizado tanto en los influentes de entrada a la depuradora como en los efluentes tras los tratamientos de desinfección aplicados, así como en la EDAR que utilizó un biofiltro electroactivo como sistema final de tratamiento.

En cuanto a los niveles de clorato en los influentes de las 15 EDARs estudiadas, se mostró que en la mayoría de los casos este subproducto estaba por debajo de los límites máximos establecido tanto por la UE como por la OMS para agua potable (0.7 mg L^{-1}), aunque estos límites fueron superados puntualmente en varias EDARs (OMS, 2017; UE, 2020a). Asimismo, se observó que estos niveles fueron extremadamente elevados con una variabilidad considerable en alguna de las depuradoras (EDAR-I), superando incluso el límite máximo hasta 40 veces. El NaClO o Ca(OCl)_2 en solución acuosa son disociados a las formas activas del cloro (HOCl/ClO^-). Posteriormente, la degradación del ClO^- resultaría en la formación de clorato (ClO_3^-) y perclorato (ClO_4^-), con un paso previo de formación de clorito (ClO_2^-). Por este motivo, un aumento en la concentración de desinfectante conducirá a una mayor formación de clorato (AHDB, 2016). Los muestreos

de estos influentes se realizaron entre los meses de junio a diciembre de 2020, por lo que el uso excesivo de desinfectantes clorados por la población durante la pandemia de COVID-19 pudo haber repercutido en el aumento de los niveles de clorato en los influentes muestreados y explicar los altos niveles encontrados en algunos de los muestreos llevados a cabo. Este hecho debe ser tenido en consideración ya que, si el influente que entra a la depuradora ya presenta altos niveles de estos subproductos, quizá por el excesivo uso de desinfectantes clorados por parte de la población, estas concentraciones pueden incrementarse tras los tratamientos de desinfección aplicados en las distintas EDARs. En relación a esto, Li y col. (2021) llevaron a cabo un estudio similar muestreando, entre otros tipos de aguas, efluentes de aguas residuales domésticas en China durante la pandemia de COVID-19 y analizando entre otros DBPs, las concentraciones de THMs y HAAs. Aunque observaron algunas concentraciones puntualmente elevadas, estos investigadores concluyeron que el elevado uso de desinfectantes clorados no resultó en un aumento considerable de la concentración de DBPs en las aguas muestreadas. Asimismo, Bermejo y col. (2021), obtuvieron valores de clorato menores a 10 mg L^{-1} , cuando muestrearon los influentes de cinco EDARs de la Región de Murcia.

Por otra parte, la mayoría de los DBPs, los cuales son de naturaleza orgánica, se forman debido a la reacción de los desinfectantes, especialmente clorados, con la materia orgánica presente en estas aguas. Por este motivo, la materia orgánica juega un papel fundamental en la formación y contenido de los distintos tipos de DBPs, atendiendo a factores como su estructura, hidrofobicidad o peso molecular (Liang y Singer, 2003; Diemert y col., 2013; Korotta-Gamage y Sathasivan, 2017; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021). En relación a esto, los principales constituyentes de la materia orgánica contenida en los efluentes de una EDAR consisten en productos microbianos solubles derivados de

los tratamientos biológicos, por lo que esta matriz presenta una estructura compleja en comparación con otras matrices más sencillas como puede ser el agua potable. De forma general, las aguas residuales contienen más compuestos hidrofílicos que favorecen la incorporación de halógenos, promoviendo una mayor formación de DBPs, especialmente compuestos nitrogenados y bromados (Du y col., 2017; Zhong y col., 2019). Asimismo, y aunque la formación de los diferentes tipos de DBPs es muy compleja y depende de varios factores, tales como las condiciones de desinfección y los precursores presentes en las aguas, cada desinfectante está asociado a la formación de unos subproductos de desinfección característicos (Simpson y Mitch, 2022). En relación a esto, los resultados de la monitorización de los distintos tipos de DBPs agrupados según las tecnologías de desinfección utilizadas, mostraron una clara relación entre la desinfección con cloro y cloro/UV y el considerable aumento de los DBPs (THMs, HAAs y clorato). Aunque tal y como se ha comentado anteriormente, la formación de estos subproductos, especialmente en el caso de los DBPs orgánicos, depende de diversos factores además del desinfectante utilizado, tales como el contenido en materia orgánica, la dosis de desinfectante, la temperatura, el pH, el tiempo de reacción o los constituyentes del agua (Domínguez-Tello, 2017; Srivastav y col., 2020; Kali y col., 2021; Sinha y col., 2021). En relación a esto, los resultados mostraron la variación en los parámetros físico-químicos de los distintos efluentes, atendiendo a la EDAR estudiada y al muestreo llevado a cabo, influyendo estos parámetros en la formación de los distintos tipos de DBPs. Sin embargo, la monitorización de los DBPs en los efluentes de las distintas EDARs a lo largo del tiempo, mostró de forma inequívoca que la utilización de cloro o cloro/UV aumentó significativamente la presencia de THMs, HAAs y clorato de los efluentes tratados, aún con grandes variaciones en las características físico-químicas de las aguas. Sin embargo, cuando las mismas EDARs cambiaron los tratamientos de desinfección a PAA, UV o

PAA/UV, los DBPs se redujeron drásticamente incluso a niveles por debajo del LoQ. Por tanto, este estudio puso en evidencia los beneficios de la aplicación de alternativas de desinfección a la utilización del cloro, tales como PAA, UV o la combinación de ambos tratamientos, de manera que se pueda reducir la presencia de DBPs en los efluentes generados para la utilización en el riego agrícola, siempre y cuando estas tecnologías mantengan la seguridad microbiológica y química de las aguas regeneradas (UE, 2020b).

En relación a esto, Li y col. (2019), mostraron valores de THMs y HAAs de 28 y 47 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, en efluentes clorados provenientes de EDARs. Asimismo, Bermejo y col. (2021), en su estudio en aguas regeneradas cloradas procedentes de cinco EDARs de la Región de Murcia y destinadas al riego agrícola, mostraron niveles de clorato y THMs no muy elevados, variando entre 0.4-1.5 mg L^{-1} para clorato, y entre 7-218 $\mu\text{g L}^{-1}$ para THMs. En cambio, en el estudio llevado a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se obtuvieron valores más elevados, observándose para la desinfección con cloro concentraciones promedio de 329 $\mu\text{g L}^{-1}$, 418 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 18.3 mg L^{-1} para THMs, HAAs y clorato, respectivamente. Asimismo, estas concentraciones fueron todavía mayores cuando se empleó la combinación de cloro/UV como método de desinfección, con valores promedio de 743 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1314 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 54.3 mg L^{-1} , para THMs, HAAs y clorato, respectivamente. Estas concentraciones sobrepasaron ampliamente los límites establecidos para estos DBPs en agua potable (USEPA, 1998, 2006; OMS, 2017; UE, 2020a). Asimismo, aunque las concentraciones de DBPs variaron en la desinfección con cloro y cloro/UV, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Estos resultados coinciden con los mostrados por Hua y col. (2021), que también observaron un aumento de THMs y HAAs en la desinfección con cloro/UV, en comparación con la utilización de cloro en efluentes procedentes de EDARs. En cambio, Bulman y Remucal (2020), observaron un aumento en el contenido de HAAs y una

reducción de THMs con la aplicación de cloro/UV comparada con la desinfección con cloro.

La fotólisis del cloro mediante procesos de oxidación avanzada (AOPs) forma en primera instancia radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y cloro ($\text{Cl}\bullet$), dando lugar posteriormente a especies reactivas del cloro (RCS) secundarias, tales como radical dicloro ($\text{Cl}_2\bullet$) o radicales óxido de cloro o anión cloro-hidróxido ($\text{ClO}\bullet$ y $\text{ClOH}\bullet$). Las aplicaciones conjuntas de estas dos tecnologías de desinfección tienen un efecto sinérgico en su acción antimicrobiana, así como en la degradación de materia orgánica, microcontaminantes recalcitrantes e incluso DBPs presentes en las aguas (Wang y col., 2016b; Guo y col., 2017; Yeom y col., 2021). Diversos estudios han relacionado la aplicación conjunta de cloro/UV, así como la presencia de estas RCS, con una mayor formación de DBPs orgánicos (Hua y col., 2019), tal y como reflejaron los resultados derivados de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, existe discrepancia sobre este tema e investigaciones recientes apuntan que comparado con la desinfección utilizando únicamente cloro, la aplicación conjunta de cloro/UV puede incrementar o reducir la formación de DBPs. Luo y col. (2020), mostraron que la aplicación conjunta de cloro/UV podría reducir la dosis de cloro utilizada para mantener la seguridad microbiológica reduciendo por tanto la formación de DBPs. Sin embargo, también señalaron que la aplicación de cloro/UV produjo radicales libres que podrían reaccionar con la materia orgánica, aumentando los precursores de DBPs. En este sentido, se ha demostrado el aumento de la formación de los DBPs cuando se aplica un tratamiento basado en cloro/UV seguido de un proceso de cloración posterior. La aplicación conjunta de cloro/UV podría afectar a la formación de DBPs, modificando los precursores orgánicos que posteriormente reaccionarían con el cloro en una cloración posterior (Yeom y col., 2021). Asimismo, la formación de clorato como subproducto en aguas residuales cloradas también ha sido estudiada. El clorato ha sido descrito como uno

de los mayores subproductos de la fotólisis del cloro (Kishimoto, 2019). La fotólisis del cloro da lugar a clorato a través de la dimerización del ClO^\bullet , y las posteriores reacciones de los productos. Por lo tanto, cualquier factor que afecte a la concentración de ClO^\bullet , afectará también a la formación de clorato (Buxton y Subhani, 1972; Wang y col., 2019). Rott y col. (2018), observaron concentraciones de clorato de 1.04 y 1.11 mg L^{-1} en efluentes tratados con cloro/UV, con concentraciones de cloro libre de 5 y 6 mg L^{-1} , respectivamente, hecho que correspondía con una conversión de cloro a clorato en proporciones molares de 16-18%. Asimismo, los resultados mostrados en el estudio llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral demostraron que la utilización de cloro/UV como tecnología desinfección favoreció la formación de clorato en las aguas residuales estudiadas.

Por otra parte, la presencia de THMs y HAAs se ha utilizado como un indicador de los DBPs regulados en agua (Tak y col., 2020). En el estudio llevado a cabo, las concentraciones de THMs, HAAs e incluso clorato siguieron una tendencia similar a lo largo de la mayoría de puntos de muestreo. En cuanto a los HAAs, es necesario mencionar que se cuantificó la presencia de HAA9, aunque la regulación para agua potable sólo tiene en cuenta la suma de HAA5. Si bien es cierto que la mayoría de DBPs fueron detectados bajo los tratamientos de cloro y cloro/UV, puntualmente, se detectaron niveles de THM4 y HAA9 bajo tratamientos con PAA, UV o la combinación de ambos, probablemente, y tal y como se ha mencionado anteriormente, debido al aumento de desinfectantes clorados por parte de la población (Li y col., 2021). En relación a esto, Domínguez-Henao y col. (2018a) apuntaron que con altas concentraciones de PAA, los iones haluro pueden ser oxidados a ácidos hipohalosos, reaccionando éstos con la materia orgánica para formar DBPs halogenados, habiendo sido descrito particularmente para DBPs bromados en soluciones con presencia de bromuro.

Asimismo, los resultados de la monitorización de los DBPs llevada a cabo en este estudio pone en evidencia los beneficios del PAA, UV o PAA/UV como alternativa al cloro para su implementación como tratamiento de desinfección para las aguas regeneradas destinadas al riego agrícola. En cuanto a la radiación UV, aunque esta tecnología se ha mostrado como un tratamiento de desinfección que evita la formación de DBPs, podría presentar ciertas desventajas, ya que su eficacia de desinfección depende de la transmitancia de la radiación en el agua por lo que, en aguas con altas concentraciones de DQO y materiales particulados y/o disueltos, la transmitancia será baja y, por tanto, también su acción antimicrobiana (Lazarova y col., 1999; Gómez-López, 2012; Millan-Sango y col., 2017; Collivignarelli y col., 2021). En cuanto al PAA, Domínguez-Henao y col. (2018a), concluyeron que la mayoría de DBPs formados con este desinfectante fueron ácidos carboxílicos, con formación limitada o inexistente en compuestos halogenados, aldehídos, epóxidos y N-nitrosaminas. Asimismo, estos autores han mostrado al PAA como una alternativa a los compuestos a base de cloro para la desinfección de aguas residuales, reduciendo las concentraciones de DBPs, así como de otros residuos persistentes para el medio ambiente. En relación a esto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral mostraron que el PAA, combinado o no con UV, pudo reducir los DBPs estudiados en un 95-100%. Sin embargo, aunque el PAA tiene un amplio espectro y eficiencia en la inactivación de microorganismos, incluso en presencia de materia orgánica, este desinfectante podría presentar algunas desventajas frente al cloro, como su mayor costo y su cinética de inactivación microbiana más lenta (Kitis, 2004; Van Haute y col., 2017; López-Gálvez y col., 2020). Por otra parte, la aplicación de un tratamiento de desinfección basada en la aplicación conjunta de PAA/UV es una tecnología emergente cada vez más utilizada, especialmente para el tratamiento de aguas residuales, aumentando la capacidad desinfectante, ya que además de la acción directa de

ambas tecnologías por separado (PAA y UV) también se produce una acción sinérgica a través de la generación de especies reactivas derivadas de la fotólisis del PAA, aumentando la acción antimicrobiana, y pudiendo a su vez reducir la dosis aplicada de PAA. Asimismo, esta tecnología también se ha descrito en la eliminación de microcontaminantes, y resulta una alternativa eficaz a los desinfectantes clorados en cuanto al control de la formación de DBPs. Además, la desinfección basada en la aplicación de PAA/UV se muestra como una metodología simple, respetuosa con el medio ambiente y relativamente rentable, sin embargo, resulta una tecnología emergente por lo que deben realizarse más estudios a gran escala (Ao y col., 2021).

Igualmente, tal y como se ha indicado anteriormente, en la desinfección con cloro, parámetros como el contenido y tipo de la materia orgánica presente en las aguas, así como la dosis de desinfectante utilizado, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción son parámetros decisivos para la generación de DBPs orgánicos, tales como THMs y HAAs (Chowdhury y col., 2009). En cuanto a la formación de clorato, la concentración de este subproducto podría ser reducida disminuyendo la dosis de desinfectante aplicada, siempre y cuando se mantenga la seguridad microbiológica (Wang y col., 2019). Asimismo, ante la formación de DBPs con la utilización de desinfectantes clorados, además de la utilización de desinfectantes alternativos, tal y como se ha comentado anteriormente, se muestran dos estrategias para la reducción de estos subproductos. En primer lugar, la reducción de los precursores de los DBPs previo al proceso de desinfección, especialmente la materia orgánica presente en las aguas residuales, y, en segundo lugar, la eliminación de los DBPs formados en las aguas, a través de tecnologías de limpieza apropiadas. En relación a esto, las estrategias que se pueden utilizar como parte del tratamiento terciario tales como los procesos de coagulación-floculación, tecnologías de membrana, resinas de intercambio iónico o catiónico o procesos de

adsorción con carbón activo serían apropiados para reducir los precursores de los DBPs, previo al proceso de desinfección (Ruiz-Zapata, 2001; Bueno y col., 2020; Sinha y col., 2021). Por otra parte, aunque se debe seguir profundizando en cuanto a tecnologías para la eliminación de los DBPs formados, se ha descrito que la utilización de procesos de intercambio aniónico, tecnologías de adsorción, tratamientos biológicos, aplicación de AOPs, así como tecnologías de membrana podrían ser tratamientos efectivos para la eliminación de los DBPs generados en las aguas (Srivastav y col., 2020).

Por último, es necesario hacer hincapié en que, aunque existe una regulación de los DBPs estudiados para agua potable, y estos valores límites son los que se han tomado como referencia en este estudio (USEPA, 1998, 2006; OMS, 2017; UE, 2020a), la legislación no establece límites máximos permitidos en cuanto al control de los DBPs en las aguas regeneradas para su uso en agricultura (UE, 2020b). Su control queda regulado como parte de los requisitos adicionales de la norma, que establece que podrían ser identificados como peligros potenciales para el medio ambiente, la salud humana o la sanidad animal, tras la realización de una evaluación de riesgos que lo determine. Sin embargo, este estudio ha puesto en evidencia la potencial presencia de DBPs en aguas regeneradas tras un tratamiento de cloración y el posible riesgo que puede entrañar la utilización de estas aguas regeneradas, si los tratamientos de desinfección no son sustituidos por otros (PAA, UV, PAA/UV), que reduzcan considerablemente la generación de estos DBPs. En este sentido, y aunque los estudios acerca de la acumulación de THMs y HAAs en cultivos regados con aguas regeneradas ricas en estos subproductos son muy limitados, la acumulación de clorato durante el riego de cultivos sí ha sido estudiada. Garrido y col. (2020) establecieron que el riego con agua regenerada clorada puede producir la acumulación de clorato en lechuga fresca, pudiendo sobrepasar el nivel máximo residual regulado por la UE para este producto (0.7 mg kg^{-1}), debido a la

continua incorporación de clorato durante el riego, demostrando que a pesar de una concentración de clorato relativamente baja en el agua regenerada (0.2 mg L^{-1}), las lechugas regadas con estas aguas presentaron altas concentraciones de clorato (0.6 mg kg^{-1}), debido a la continua acumulación de estos subproductos a lo largo del ciclo de crecimiento de las plantas (EU, 2020c). Por tanto, teniendo en cuenta la influencia de los tratamientos de desinfección utilizados en este estudio en la generación de THMs, HAAs y clorato en el agua de riego, resulta necesaria la utilización de aquellas tecnologías que prevengan la acumulación de DBPs en las aguas regeneradas, de manera que se elimine o al menos se reduzca el riesgo químico derivado de la posible acumulación en el alimento vegetal regado.

CAPÍTULO VIII

Estudio de la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la obtención de proteína vegetal y de su tratamiento con el fin de revalorizar su aprovechamiento y de reducir el impacto del vertido al medio ambiente

Albolafio S., Gil, M.I., Allende, A., Xanthakis, E. (2021). Potential of Wastewater Valorization after Wet Extraction of Proteins from Faba Bean and Pea Flours. Recent Progress in Materials, 3(2). <https://doi.org/10.21926/rpm.2102013>.

1. OBJETIVO

Este estudio tuvo como objetivo principal la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la extracción proteica húmeda (alcalina y ácida), utilizando harina de haba (*Vicia faba*) y guisante (*Pisum sativum*) y realizando un proceso para el aislado de las proteínas de manera similar a como se realiza en la industria. En primer lugar, se llevó a cabo la caracterización físico-química de las aguas recolectadas, de manera que se evaluó el posible impacto medioambiental de las mismas, así como el posterior estudio de metodologías para su tratamiento y reutilización, como la filtración por membrana. En primer lugar, las fracciones de agua fueron caracterizadas mediante la medida de los parámetros físico-químicos como la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales (ST), sólidos disueltos totales (SDT), conductividad eléctrica (CE), pH y turbidez. Estas fracciones fueron posteriormente filtradas con la finalidad de evaluar diferentes tecnologías de membrana para el tratamiento de las aguas. Para ello se utilizaron filtros de 0.2 μm y 0.1 μm , de tamaño de poro. Posteriormente, se determinó los parámetros de ST, SDT, CE y pH de las aguas filtradas por 0.2 μm y por 0.1 μm . La DQO y la turbidez también se determinaron en aquellas filtradas por 0.2 μm . Asimismo, se evaluó la presencia de compuestos de alto valor añadido en las fracciones de agua recogidas, mediante determinaciones tales como el contenido de proteínas totales, carbohidratos, el perfil polifenólico, así como la cuantificación de compuestos fenólicos individuales y totales y la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos se compararon según la matriz utilizada (harina de haba y guisante), el tipo de proceso de extracción (extracción alcalina y ácida) y etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas), utilizando para ello la prueba t de Student para la comparación de medias ($p < 0.05$).

La metodología de este estudio se ha incluido en las secciones 5 (Extracción de proteína de harina de haba y guisante y obtención de las aguas de proceso), 6.1 (Análisis físico-químico y microbiológico) y 6.2 (Análisis de compuestos de valor añadido).

2. RESULTADOS

2.1. Caracterización de las fracciones de agua recogidas tras la extracción proteica

En primer lugar, en cuanto a las fracciones de agua obtenidas tras el aislado proteico de la harina de haba, la mayoría de los parámetros evaluados mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la primera y la segunda fracción de las aguas residuales recolectadas, siendo los valores de DQO, ST, SDT y CE alrededor de un 66%-89%, 88%-92%, 89%-90% y 87%-90%, respectivamente, mayores en la primera fracción de aguas, en comparación con la segunda (**Tabla 8.1**). En cuanto al tipo de extracción, aunque se observaron algunas diferencias significativas, no fueron cuantitativamente relevantes, excepto en el caso de la DQO medida en la segunda fracción de las aguas residuales ($p < 0.001$), que fue un 59% superior, en la extracción ácida que en la alcalina.

Tabla 8.1. Parámetros físico-químicos de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de la harina de haba.

Parámetros	Tipo de extracción	Etapas del proceso de extracción	
		Primera	Segunda
DQO (mg L⁻¹)	Alcalina	5940±165	653±17***
	Ácida	4746±37	1599±79***
		+++	+++
Sólidos totales (g L⁻¹)	Alcalina	10.2±0.1	0.8±0.1***
	Ácida	9.4±0.8	1.1±0.2***
		+	++
Sólidos disueltos totales (°Brix)	Alcalina	0.9±0.1	0.1±0.1***
	Ácida	1.0±0.1	0.1±0.0***
		ns	ns
Conductividad eléctrica(mS cm⁻¹)	Alcalina	4.02±0.06	0.40±0.02***
	Ácida	4.49±0.40	0.58±0.03***
		ns	++
pH	Alcalina	4.53±0.01	4.64±0.04**
	Ácida	4.46±0.01	4.50±0.08 ns
		+++	+

Los valores están expresados como el promedio ± desviación estándar de al menos tres réplicas, correspondiendo los datos al conjunto de muestras evaluadas (sin filtrar y filtradas). Las diferencias significativas para cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas) se muestran en la misma fila y las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) se muestran en la misma columna. El análisis estadístico de acuerdo con la prueba t de Student se muestra como * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); + (p<0.05), ++ (p<0.01), +++ (p<0.001) y ns (no significativo).

En el caso de las fracciones de agua recogidas tras la extracción proteica de la harina de guisante, la mayoría de los parámetros evaluados también mostraron diferencias significativas ($p < 0.001$) entre la primera y la segunda fracción de las aguas residuales (**Tabla 8.2**), siendo los valores de DQO, ST, SDT y CE entre el 86-91%, 89-91%, 88-90% y 88-90% superiores, respectivamente, en la primera fracción en comparación con la segunda. En cuanto al tipo de extracción, aunque se observaron diferencias significativas cuando los dos procesos de extracción (extracción alcalina y ácida) se compararon, al igual que ocurrió anteriormente, éstas no fueron cuantitativamente relevantes, excepto para la DQO evaluada en la segunda fracción de la extracción ácida ($p < 0.001$), la cual fue mayor (en un 36%, aproximadamente). Asimismo, cuando los distintos parámetros físico-químicos caracterizados se compararon, atendiendo a la matriz empleada en la extracción proteica (harina de haba y guisante), aunque se observaron diferencias significativas, únicamente fueron cuantitativamente relevantes para la DQO analizada en la primera etapa de extracción, ($p < 0.001$), siendo un 25%-39% mayor en la fracción de agua proveniente del guisante que en el haba, independientemente del tipo de proceso de extracción utilizado.

Tabla 8.2. Parámetros físico-químicos de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de la harina de guisante.

Parámetros	Tipo de extracción	Etapas del proceso de extracción	
		Primera	Segunda
DQO (mg L⁻¹)	Alcalina	7909±127	700±37***
	Ácida	7794±332	1095±45***
		ns	+++
Sólidos totales (g L⁻¹)	Alcalina	9.2±0.3	0.8±0.0***
	Ácida	9.8±0.4	1.1±0.0***
		+	+++
Sólidos disueltos totales (°Brix)	Alcalina	0.8±0.1	0.1±0.0***
	Ácida	1.0±0.1	0.1±0.1***
		+	ns
Conductividad eléctrica(mS cm⁻¹)	Alcalina	2.57±0.08	0.30±0.00***
	Ácida	4.13±0.20	0.42±0.03***
		+++	++
pH	Alcalina	4.58±0.02	4.63±0.04 ns
	Ácida	4.42±0.02	4.17±0.04 **
		++	+++

Los valores están expresados como el promedio ± desviación estándar de al menos tres réplicas, correspondiendo los datos al conjunto de muestras evaluadas (sin filtrar y filtradas). Las diferencias significativas para cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas) se muestran en la misma fila y las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) se muestran en la misma columna. El análisis estadístico, de acuerdo con la prueba t de Student, se muestra como * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); + (p<0.05), ++ (p<0.01), +++ (p<0.001) y ns (no significativo).

En cuanto a las determinaciones de turbidez, los resultados también mostraron diferencias significativas entre las fracciones de aguas recolectadas, atendiendo a la etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas residuales) y el tipo de extracción (alcalina y ácida) ($p < 0.001$) (**Tabla 8.3**). La turbidez fue alrededor de un 90-97% mayor en la primera fracción de aguas residuales, en comparación con la segunda, en el caso de la extracción alcalina. Sin embargo, en la extracción ácida, la turbidez fue un 60-90% mayor en la segunda fracción de aguas residuales, en comparación con la primera. Asimismo, tal y como se observó en otros de los parámetros evaluados, los resultados de turbidez fueron influenciados por el pH de la extracción proteica. Los resultados indicaron que el pH ajustado para la solubilización de las proteínas durante la primera etapa de la extracción, fue un factor crítico. Asimismo, y tal y como se ha indicado anteriormente, las diferentes fracciones de agua recolectadas fueron filtradas, con la finalidad de evaluar diferentes tecnologías de membrana para el tratamiento de estas aguas. Sin embargo, la filtración de las aguas residuales no repercutió en la mayoría de los parámetros estudiados (DQO, ST, SDT, CE y pH), sin diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las muestras filtradas y sin filtrar. Por este motivo, para el estudio y análisis estadístico de estos parámetros (DQO, ST, SDT, CE y pH), se agruparon los resultados de las muestras filtradas y sin filtrar. Asimismo, se observó que la filtración de las aguas afectó a la turbidez. La utilización de esta tecnología de membrana provocó una disminución significativa de la turbidez ($p < 0.001$) (**Tabla 8.3**). Concretamente, los resultados mostraron que la filtración redujo la turbidez entre un 85-99%, independientemente del tipo de matriz, tipo de proceso de extracción o etapa de extracción.

Tabla 8.3. Turbidez (UNT) de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de las harinas de haba y guisante y la influencia de la filtración.

Matriz	Tipo de extracción	Etapas del proceso de extracción y filtrados			
		Primera	Primera filtrada	Segunda	Segunda filtrada
Haba	Alcalina	183.9±0.3	1.7±0.1***	5.6±0.4	0.2±0.0**
	Ácida	9.2±0.2	1.3±0.1***	73.5±4.9	3.3±0.0**
		+++		++	
Guisante	Alcalina	130.6±0.3	4.4±0.3***	10.1±0.5	0.1±0.0**
	Ácida	12.7±0.3	1.7±0.1***	39.7±0.0	0.8±0.0***
		+++		++	

Los valores están expresados como el promedio ± desviación estándar de dos réplicas. Las diferencias significativas para la misma etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas) y sus filtrados se muestran en la misma fila y las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) se muestran en la misma columna. El análisis estadístico, de acuerdo con la prueba t de Student, se muestra como * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); + (p<0.05), ++ (p<0.01), +++ (p<0.001) y ns (no significativo).

2.2. Revalorización de las aguas residuales del haba y del guisante para la recuperación de proteínas

La determinación del contenido de proteínas totales en las fracciones de agua se llevó a cabo para la posible revalorización de estas aguas, y como una medida indirecta de la eficiencia del proceso de extracción proteica realizado. Los resultados se compararon en función de la matriz utilizada, del tipo y de la etapa del proceso de extracción llevados a cabo. En la mayoría de casos se observaron diferencias significativas cuando las fracciones de aguas residuales se compararon atendiendo a la

etapa del proceso de extracción ($p < 0.01$) (**Figura 8.1**). En relación a esto, el contenido en proteínas totales fue alrededor de un 65-88% superior en la primera fracción de aguas residuales, en comparación con la segunda, independientemente de la matriz y el tipo de extracción. Asimismo, cuando las aguas se compararon atendiendo al tipo de extracción utilizada, el análisis estadístico no mostró diferencias entre las extracciones alcalina y ácida en la primera fracción de aguas residuales. Sin embargo, cuando esta comparación se realizó en la segunda fracción de las aguas recolectadas, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$). El contenido de las proteínas totales en las fracciones de aguas residuales derivadas de la extracción ácida de la harina de haba y guisante fueron un 72% y 53% mayores, respectivamente, en comparación con la extracción alcalina.

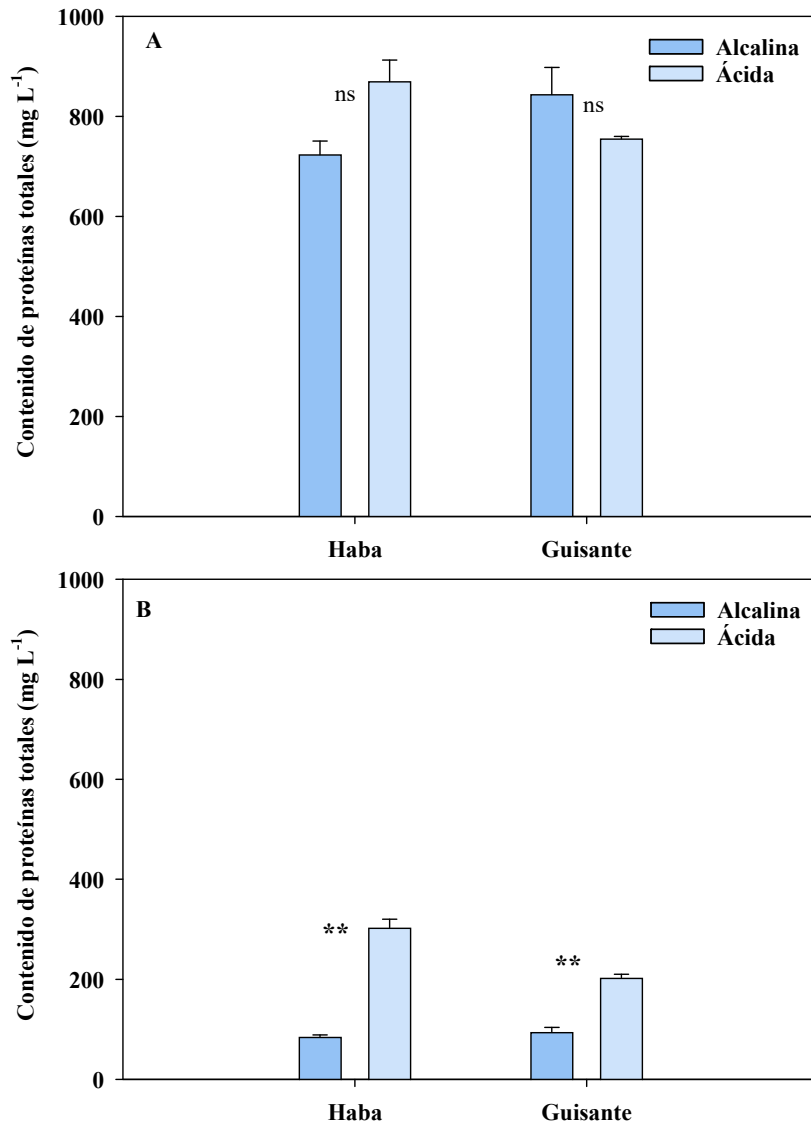


Figura 8.1. Contenido total de proteínas en (A) las primeras fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante y (B) las segundas fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) en cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

2.3. Revalorización de las aguas residuales del haba y del guisante para la recuperación de carbohidratos

El análisis por HPLC acoplado a un detector de índice de refracción reveló la presencia de carbohidratos en las fracciones de agua recogidas tras el aislamiento de proteínas (**Tabla 8.4**). Sin embargo, entre los cuatro carbohidratos analizados (sacarosa, fructosa, glucosa y galactosa) únicamente se detectó sacarosa. Asimismo, la primera fracción mostró un mayor contenido de este azúcar (82-92%) ($p < 0.001$) que la segunda, independientemente del tipo de proceso de extracción y de la matriz utilizada. Asimismo, si se compara el tipo de proceso de extracción utilizado, se puede observar que el contenido en sacarosa de la primera fracción de aguas residuales tras la extracción ácida de harina de guisante fue alrededor de un 67% superior que en la misma fracción de aguas residuales procedentes de la harina de haba ($p < 0.001$). Sin embargo, lo contrario ocurrió para la extracción alcalina.

Tabla 8.4. Contenido en sacarosa (mg L⁻¹) de las fracciones de agua tras la extracción proteica alcalina y ácida de las harinas de haba y guisante.

Matriz	Tipo de extracción	Etapas del proceso de extracción	
		Primera	Segunda
Haba	Alcalina	1598 ± 29	115 ± 5***
	Ácida	726 ± 21 +++	125 ± 7*** ns
Guisante	Alcalina	1215 ± 10	138 ± 13***
	Ácida	2168 ± 147 +++	189 ± 31*** ns

Los valores están expresados como el promedio ± desviación estándar de tres réplicas. Las diferencias significativas para la etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas) se muestran en la misma fila y en las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) se muestran en la misma columna. El análisis estadístico, de acuerdo con la prueba t de Student, se muestra como * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); + (p<0.05), ++ (p<0.01), +++ (p<0.001) y ns (no significativo).

2.4. Revalorización de las aguas residuales del haba y del guisante para la recuperación de compuestos fenólicos

En cuanto al contenido de fenoles totales, éste fue alrededor de un 81-87% mayor en la primera fracción de aguas residuales (p<0.001) que la segunda, independientemente de la matriz utilizada o del tipo de proceso de extracción (**Figura 8.2**). Asimismo, cuando el contenido de fenoles totales se estudió en la primera fracción de aguas residuales, los resultados mostraron que las fracciones de aguas procedentes de la extracción de haba tenían un contenido alrededor de un 34-39% (p<0.001) mayor que en las aguas procedentes de la extracción de guisante, independientemente del tipo de proceso de extracción.

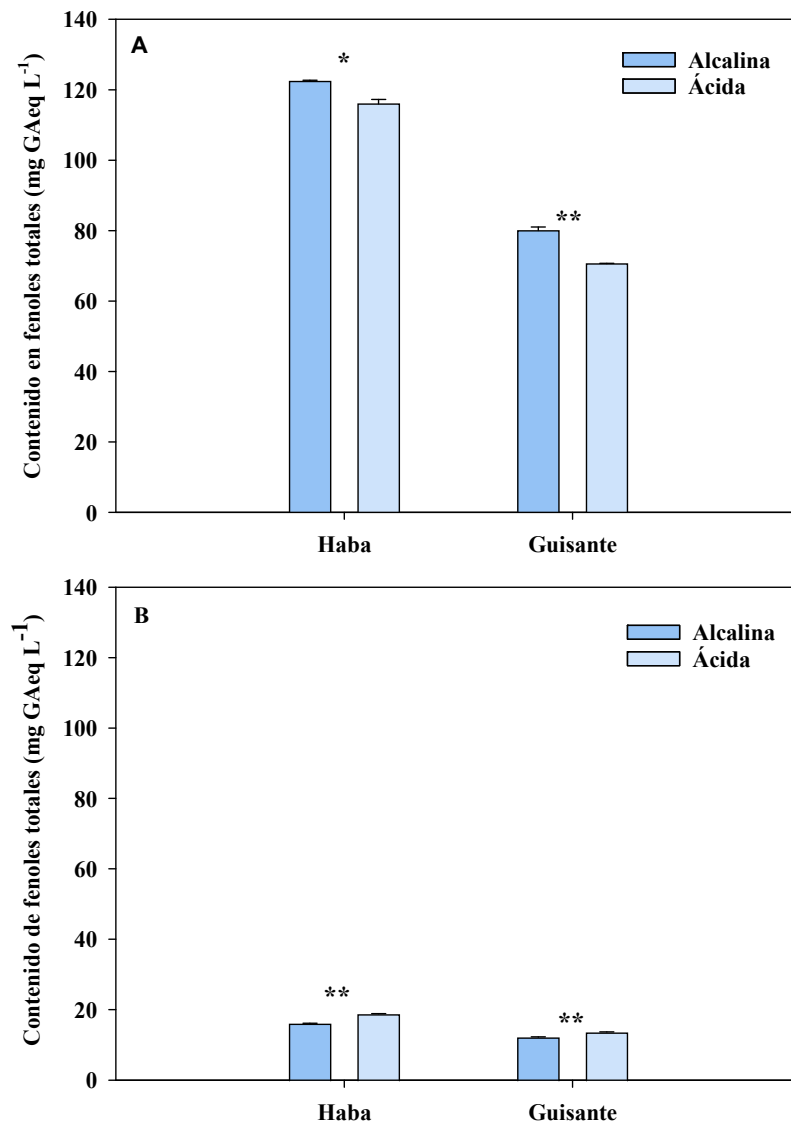


Figura 8.2. Contenido en fenoles totales en (A) las primeras fracciones de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba y guisante y (B) las segundas fracciones de agua tras las extracciones alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida) en cada etapa del proceso de extracción (primera y segunda fracción de aguas), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

El contenido de fenoles totales fue considerablemente mayor en la primera fracción de aguas residuales. Por este motivo la identificación y cuantificación de los

polifenoles individuales se realizó, únicamente, en esta fracción. Asimismo, el análisis por HPLC-DAD-ESI-IT (MS^n) mostró diferencias en cuanto al perfil polifenólico entre las fracciones de aguas tras la extracción de las proteínas de haba y de guisante. Los polifenoles se identificaron atendiendo a su orden de elución por HPLC, su espectro UV, su masa y su perfil de fragmentación MS/MS. Además, su cuantificación se llevó a cabo en UV, utilizando los estándares disponibles para cada familia de polifenoles (**Tablas 8.5 y 8.6**). Las fracciones de agua recogidas tras las extracciones alcalina y ácida del haba mostraron cromatogramas muy parecidos, con picos muy juntos y de baja intensidad, dificultando su identificación y cuantificación (**Figura 8.3**). Se identificaron dos glucósidos flavonoides, quercetina-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido, presentando ambos flavonoides una concentración similar (**Tabla 8.5**). Asimismo, el análisis de las fracciones de agua recogidas tras las extracciones alcalina y ácida del guisante también mostraron cromatogramas similares, pero con picos más separados y con una mayor intensidad, permitiendo la identificación y cuantificación de los polifenoles (**Figura 8.4**). En este caso se identificó y cuantificó un flavonoide (kaempferol-triglucósido) y cinco ácidos fenólicos (ácido cafeico-glucósido, ácido feruloil-málico, ácido ferúlico, ácido p-cumaroil-málico, ácido p-hidroxibenzoil-málico-glucósido) (**Tabla 8.6**). Asimismo, en las fracciones de la extracción de harina de guisante, la concentración de los polifenoles identificados de la fracción ácida fue superior a la alcalina.

Tabla 8.5. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos en la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba.

	Grupo	Compuesto	Tiempo retención (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻	Fragmentos MS ²	Fragmentos MS ³	Cuantificado indirectamente como	Concentración (mg L ⁻¹)
Extracción alcalina	Flavonoides	Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	21.8	258, 356	609	447	301	Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	0.40
		Kaempferol-3-O-rutinósido	23.9	234, 266, 326	593	447, 285		Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	0.30
Extracción ácida	Flavonoides	Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	21.9	258, 356	609	447	301	Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	0.36
		Kaempferol-3-O-rutinósido	23.9	234, 266, 326	593	447, 285		Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	0.33

Tabla 8.6. Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos en la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de guisante.

	Grupo	Compuesto	Tiempo retención (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻	Fragmentos MS ²	Fragmentos MS ³	Cuantificado indirectamente como	Concentración (mg L ⁻¹)
Extracción alcalina	Flavonoides	Kaempferol-triglucósido	22.9	264, 346	771	609	285	Quercetina-3-O-rutinósido (rutina)	0.92
	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico-glucósido	14.6	314	341	179	135	Ácido cafeico	0.23
		Ácido feruloil-málico	19.2	240, 320	308	193	134	Ácido ferúlico	0.91
		Ácido ferúlico	24.8	238, 324	193	149	134	Ácido ferúlico	0.62
		Ácido p-cumaroil-málico	16.9	236, 308	278	163	119	Ácido p-cumárico	0.64
		Ácido p-hidroxibenzoil-málico-glucósido	13.5	248	414	252	136	Ácido hidroxibenzoico	0.57

Extracción ácida	Flavonoides	Kaempferol- triglucósido	22.9	264, 346	771	609	285	Quercetina-3- O-rutinósido (rutina)	1.25
	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico- glucósido	14.6	314	341	179	135	Ácido cafeico	0.35
		Ácido feruloil- málico	19.3	240, 320	308	193	134	Ácido ferúlico	1.09
		Ácido ferúlico	24.9	238, 324	193	149	134	Ácido ferúlico	0.45
		Ácido p- cumaroil-málico	17.0	236, 308	278	163	119	Ácido p- cumárico	0.75
		Ácido p- hidroxibenzoil- málico-glucósido	13.5	248	414	252	136	Ácido hidroxibenzoico	0.79

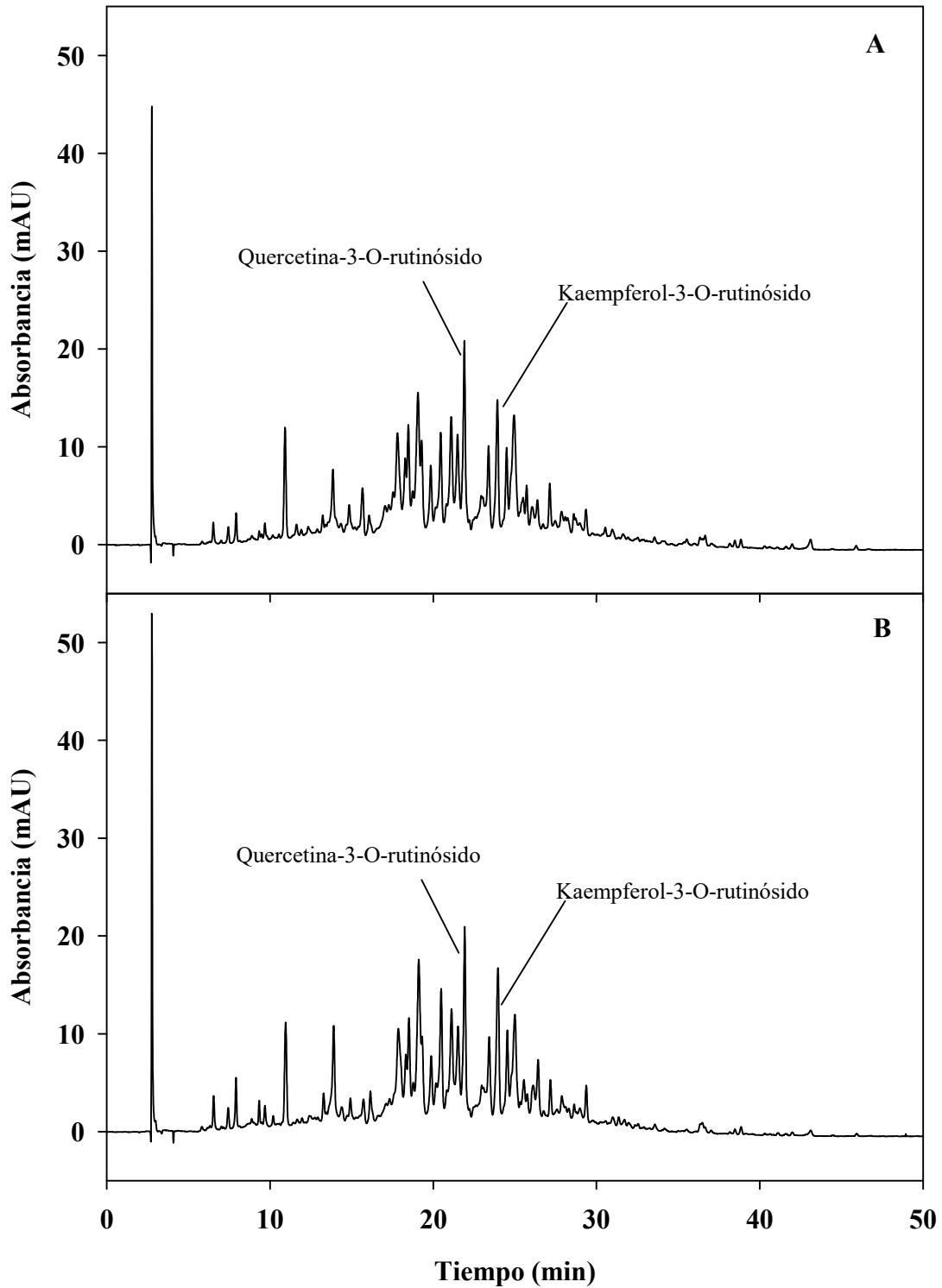


Figura 8.3. Cromatograma HPLC-DAD de la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina (A) y ácida (B) de harina de haba a 360 nm de longitud de onda.

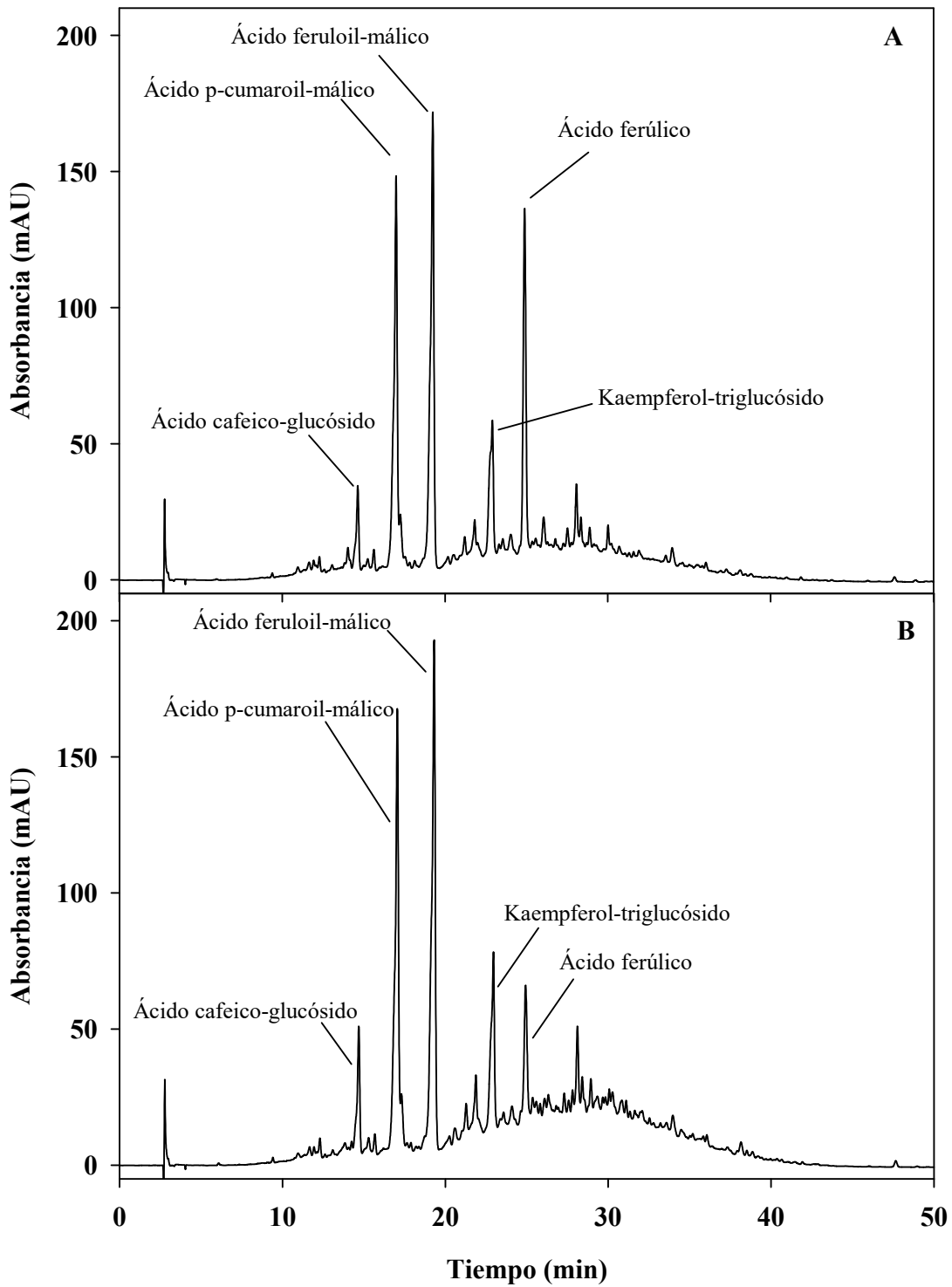


Figura 8.4. Cromatograma HPLC-DAD de la primera fracción de agua tras las extracciones proteicas alcalina (A) y ácida (B) de harina de guisante a 360 nm de longitud de onda.

2.5. Actividad antioxidante de las fracciones tras la extracción de proteica

Al igual que en la caracterización del perfil polifenólico de las aguas de proceso recolectadas, la determinación de la actividad antioxidante únicamente se realizó en las primeras fracciones de aguas residuales, ya que éstas son las que mostraron un mayor contenido de fenoles totales. Por lo tanto, los resultados únicamente se compararon atendiendo a la matriz utilizada (harina de haba y guisante) y el tipo de proceso de extracción (extracción alcalina y ácida). Estos resultados mostraron que la concentración efectiva (EC50) fue alrededor de un 84-91% superior en las fracciones de la harina de guisante que en las de haba (**Figura 8.5**). Un valor de EC50 más bajo representa una mayor actividad antioxidante, por lo que las fracciones de haba revelaron una mayor actividad antioxidante. Estos resultados fueron esperables debido a que las fracciones de aguas derivadas de la extracción del haba también mostraron un mayor contenido en fenoles totales. Sin embargo, mientras que el contenido en fenoles totales fue alrededor de un 34-39% superior en las fracciones de haba, en comparación con las de guisante, la actividad antioxidante reveló diferencias mayores entre ambas matrices. Este hecho podría deberse a diferencias en la composición polifenólica entre las fracciones de agua del haba y del guisante, ya que la actividad antioxidante se basa en el efecto sinérgico de los polifenoles presentes, su naturaleza y concentración (Xanthakis y col., 2010).

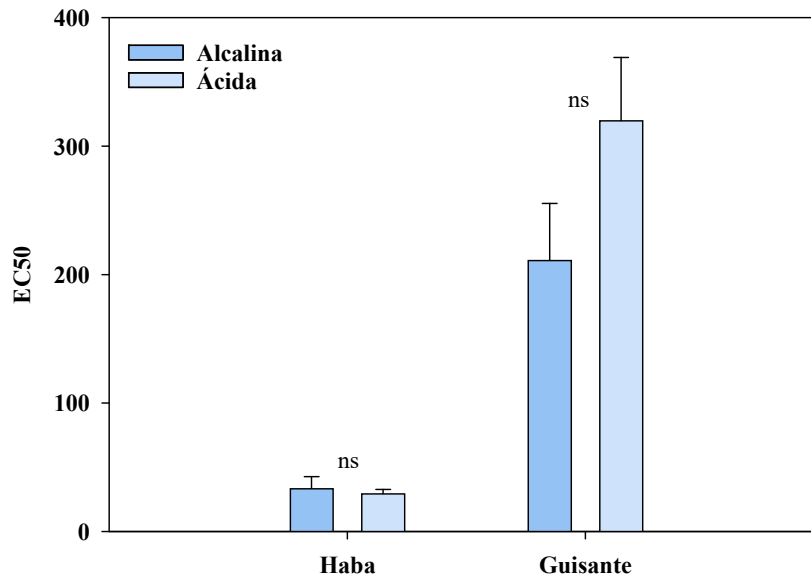


Figura 8.5. Actividad antioxidante en las primeras fracciones de agua tras las extracciones proteicas alcalina y ácida de harina de haba y guisante. Se muestran las diferencias significativas para el tipo de proceso de extracción (alcalina/ácida), de acuerdo con la prueba t de Student, como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) y ns (no significativo). Las barras corresponden a la desviación estándar del valor promedio de dos réplicas.

3. DISCUSIÓN

Las habas (*Vicia faba*) y los guisantes (*Pisum sativum*) son dos legumbres ampliamente utilizadas para la extracción de proteínas de origen vegetal, conteniendo ambas legumbres alrededor de un 25-30% de proteína, 65-69% de carbohidratos y 1.7-1.9% de lípidos, además de una pequeña proporción de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos, así como vitaminas y minerales (Boye y col., 2010a, 2010b; Turco y col., 2016; Lam y col., 2018; Millar y col., 2019; Lie-Piang y col., 2021). Para la extracción de la proteína vegetal, estas legumbres son procesadas para la obtención de harina mediante la molienda de las semillas, alcanzando una concentración de proteína alrededor del 25%. También se puede realizar el procesado de la harina en fraccionamiento por flujo de aire, obteniendo un extracto con una concentración del 50%

de proteína, o realizando un procesamiento en húmedo en condiciones alcalinas o ácidas, consiguiendo un aislado con un 85% de proteína (Boye y col., 2010a; Barac y col., 2015). Sin embargo, los procesos industriales a gran escala que producen estos aislados proteicos mediante el procesamiento en húmedo de las harinas, se caracterizan por consumir grandes cantidades de agua, generando a su vez elevados volúmenes de aguas residuales de naturaleza ácida y conteniendo material proteico y otros compuestos orgánicos provenientes de las harinas procesadas, provocando sus vertidos un gran impacto medioambiental (Schutyser y van der Goot, 2011; Mondor y col., 2012; Assatory y col., 2019). Estas aguas residuales se caracterizan por tener altos niveles de materia orgánica, aunque pueden contener a su vez una variedad de compuestos de alto valor añadido como proteínas, ácidos grasos insaturados, fibras dietéticas y polifenoles, en especial. Asimismo, la caracterización de los compuestos de alto valor añadido presentes en estas aguas, como paso inicial para su potencial revalorización, podría contribuir a la optimización del proceso, así como a la reducción del impacto medioambiental de las aguas generadas (Chen y col., 2019). Igualmente, la caracterización físico-química de estas aguas, así como la investigación de metodologías para su limpieza y reutilización, o incluso para su posterior vertido bajo unas condiciones ambientalmente sostenibles, permite abordar el proceso industrial de extracción de proteína vegetal bajo un enfoque de economía circular. Concretamente, en el estudio llevado a cabo, se analizaron diversos parámetros en las distintas fracciones de aguas recogidas tras la extracción proteica. En primer lugar, para su caracterización físico-química, pero también para la determinación de compuestos de alto valor añadido, especialmente de polifenoles. Los resultados de los distintos parámetros determinados se compararon en función el tipo de extracción (ácida y alcalina), la secuencia en la etapa de extracción (primera y segunda etapa), así como el tipo de matriz utilizada (harina de haba y guisante).

En primer lugar, los resultados mostraron que todas las aguas recolectadas tenían un alto contenido en materia orgánica y/o inorgánica, mostrando todas las fracciones analizadas un potencial impacto medioambiental en caso de vertido y evidenciando la necesidad de realizar un tratamiento de estas aguas residuales. Si bien es cierto que los parámetros físico-químicos analizados (DQO, ST, SDT, CE y turbidez) mostraron ligeras variaciones atendiendo al tipo y etapa de extracción, así como a la matriz utilizada, especialmente en el caso de la turbidez, donde el valor de pH ajustado para solubilizar las proteínas en las primeras etapas de la extracción (pH 9.5 para la extracción alcalina y pH 2.5 para la extracción ácida) resultó ser un factor crítico que influyó este parámetro. De manera general, todas las fracciones de agua caracterizadas presentaron altos niveles de materia orgánica (DQO 653-7909 mg L⁻¹) y elevadas concentraciones de sólidos totales (0.8-10.2 g L⁻¹). Igualmente, los resultados mostraron diferencias significativas entre la materia orgánica de las fracciones obtenidas en la primera y segunda etapa de extracción, siendo la DQO de las aguas residuales derivadas de la primera etapa de extracción alrededor de un 60-90% superior a la de la segunda etapa, y por tanto de mayor impacto medioambiental. En este sentido, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con aquellos mostrados por Chen y col. (2019), que indicaron que las aguas residuales derivadas del aislado proteico del procesado de la soja contienen una elevada carga orgánica, presentando altos niveles de DQO (>16000 mg L⁻¹), ST (18.2 g L⁻¹) y SST (4 mg L⁻¹). Asimismo, teniendo en cuenta las características físico-químicas de las aguas recolectadas, resultaría necesaria la implementación de tecnologías para su tratamiento y reutilización. Los métodos físicos basados en tecnologías de membrana se han aplicado previamente para el tratamiento de las aguas, así como para la recuperación de subproductos de alto valor añadido, permitiendo su posterior vertido bajo unas condiciones ambientales seguras (Casani y col., 2005). En el estudio llevado a cabo, la

microfiltración de las aguas únicamente provocó una reducción de la turbidez (>85%), independientemente del tipo de extracción y de la matriz utilizada, sin embargo, sin que el resto de parámetros físico-químicos estudiados se viese afectado por este tratamiento de membrana. La reducción en la turbidez ha sido previamente relacionada con la reducción de la materia orgánica particulada. En relación a esto, Van Haute y col. (2015), también observaron una gran disminución de la turbidez con una ligera disminución de la DQO, lo que indicaba una mínima contribución de la materia particulada a la DQO total. Por tanto, debido a que la microfiltración no afectó los niveles de DQO y ST caracterizados en las fracciones de agua, se podría decir que la carga orgánica y/o inorgánica presente en las fracciones de agua estudiadas correspondía, en mayor medida, a la presencia de sólidos disueltos.

Las tecnologías de membrana se pueden clasificar según el orden decreciente del tamaño del poro como microfiltración > ultrafiltración > nanofiltración > ósmosis inversa. Asimismo, a medida que decrece el tamaño de poro, el proceso de separación necesitaría una fuerza impulsora mayor. La microfiltración (tamaño de poro alrededor de 0.1-1.0 μm) y la ultrafiltración (tamaño de poro alrededor de 0.01-0.1 μm) son procesos de baja presión (< 2-7 bar). Igualmente, la nanofiltración (tamaño de poro alrededor de 1-10 nm), requiere presiones de hasta 25 bar. En cambio, en la ósmosis inversa (tamaño de poro <1 nm) la presión necesaria para impulsar el solvente a través de la membrana deberá ser superior a la presión osmótica de la disolución, pudiendo alcanzar hasta los 100 bar de presión. Asimismo, en cuanto a la microfiltración, debido a que esta tecnología utiliza un tamaño de poro relativamente grande, su acción se limita a la separación de partículas o sólidos en suspensión, bacterias y, en menor medida, coloides orgánicos. En cambio, los procesos de ultrafiltración tienen un rango de separación más amplio que los de la microfiltración, pudiendo eliminar esta tecnología partículas, patógenos, virus y coloides.

Las membranas de ultrafiltración, sin embargo, no siempre funcionan como una barrera completa contra la contaminación microbiana, debido a que, en la práctica, defectos en la superficie de la membrana o incluso el deterioro de la misma puede causar la penetración de bacterias. Asimismo, la efectividad de ambos procesos depende de las propiedades de la membrana, así como de las condiciones hidrodinámicas utilizadas. En ambas tecnologías de membrana se realiza frecuentemente un retrolavado regular, así como una limpieza química, para prevenir el ensuciamiento y la obstrucción de la membrana.

En el estudio llevado a cabo, la microfiltración resultó en una clara reducción de los SST en todas las fracciones de agua, sin embargo, los sólidos disueltos, los cuales representaron la carga orgánica predominante de las fracciones estudiadas, no fueron eliminados con esta tecnología de membrana. Sin embargo, tecnologías de filtración como la nanofiltración o la ósmosis inversa resultarían adecuadas para la eliminación de las sustancias disueltas, incluyendo las sales. En comparación con la ósmosis inversa, las membranas de nanofiltración muestran una mayor permeabilidad del agua y permiten operar a presiones menores, reduciendo el consumo de energía. Sin embargo, la tasa de rechazo de ambos procesos de membrana es diferente, consiguiendo la nanofiltración un rechazo de SDT alrededor del 40-60%, en comparación con la ósmosis inversa (90-98%). Como solución efectiva, estas tecnologías podrían actuar en serie, realizando un pretratamiento de las aguas mediante micro o ultrafiltración, seguido de un tratamiento con nanofiltración y ósmosis inversa (Hamingerova y col., 2015; Meneses y col., 2017; Cassano y col., 2018; Warsinger y col., 2018). Shrivastava y col. (2022), en su revisión sobre el tratamiento y reutilización de las aguas residuales de la industria alimentaria, muestra un resumen de las principales tecnologías físicas, químicas, biológicas, así como sus combinaciones. Estos autores señalan que la tecnología empleada para el tratamiento de las aguas depende de las características específicas de las mismas, sin embargo,

concluyen que la utilización de nanofiltración combinada con ósmosis inversa es una de las opciones más efectivas para el tratamiento de las aguas residuales en la industria alimentaria. Sin embargo, también apuntan que estas tecnologías presentan limitaciones debido a problemas de ensuciamiento, obstrucción de las membranas, un alto consumo de electricidad y pérdidas de agua en su utilización, por lo que sugieren investigar otras opciones competitivas como puede ser la radiación ultravioleta o la microelectrolisis. Asimismo, Chen y col. (2019), apuntan que la aplicación de tecnologías de membrana, ozonización, adsorción o extracción líquido-líquido podría reducir significativamente la DQO, los sólidos solubles y otras impurezas presentes en las aguas residuales de la industria alimentaria, aunque también señalan que estas tecnologías tienen diversos inconvenientes debido a la alta carga orgánica y la posible alta viscosidad de este tipo de aguas residuales.

Asimismo, como paso previo a la aplicación de las distintas tecnologías de tratamiento y limpieza de las aguas estudiadas, sería necesaria la recuperación de los principales compuestos de valor añadido presentes en las mismas, de manera que se realice su revalorización, con la finalidad de optimizar este proceso a nivel industrial. Los compuestos de alto valor añadido recuperados de las aguas residuales procedentes de la industria alimentaria pueden tener diversas aplicaciones tales como ingredientes para alimentos funcionales y nutracéuticos, así como aplicaciones en la industria farmacéutica (Chen y col., 2019). En el estudio llevado a cabo se realizó la determinación de proteínas, carbohidratos y el contenido en compuestos fenólicos de las aguas recuperadas, como primer paso para el conocimiento y estudio de la posible presencia de compuestos de alto valor añadido en estas aguas, y con la finalidad de determinar la viabilidad de una potencial revalorización de los compuestos determinados. En primer lugar, se determinó el contenido en proteínas para la posible revalorización de las aguas residuales, pero

también como una medida indirecta de la eficiencia de la extracción proteica llevada a cabo. El proceso de extracción comienza con la solubilización de las proteínas en medio acuoso, ajustando el pH de la solución para conseguir un medio ácido o alcalino, pero lejos del punto isoeléctrico de las proteínas, al que precipitarán posteriormente. Teniendo esto en cuenta, los resultados mostraron que todas las fracciones de agua recolectadas tenían contenido proteico, revelando las aguas recolectadas en la primera etapa de extracción un contenido alrededor de un 65-88% mayor que las de la segunda etapa. Estos resultados pusieron en evidencia la posibilidad de mejora en el rendimiento de la extracción proteica llevada a cabo, para la optimización de este proceso a escala industrial. Estos resultados mostraron que una parte de la proteína no precipitó en el punto isoeléctrico, permaneciendo en la primera fracción de agua analizada, mientras que otra parte fue solubilizada durante el proceso final de lavado del precipitado proteico, permaneciendo en la segunda fracción de agua. Este hecho podría estar relacionado con la presencia de proteínas con un punto isoeléctrico ligeramente diferente al alcanzado en la extracción proteica llevada a cabo (pH 4.5), o incluso que necesitan mayor tiempo para su precipitación. En relación a esto, se ha descrito que el contenido proteico de las fracciones obtenidas puede ser variable debido a las diferencias en las condiciones de procesado llevado a cabo y los parámetros como la temperatura, el tiempo de extracción, la relación harina/agua de la extracción, así como la solubilidad proteica del material de partida o las condiciones de centrifugación utilizadas. Asimismo, como alternativa a la precipitación isoeléctrica se podrían utilizar otras técnicas para la separación de las proteínas, como la ultrafiltración, la cual se utiliza frecuentemente aumentando el rendimiento de los aislados proteicos y cambiando ligeramente la composición de éstos (Vose, 1980; Boye y col., 2010a). Asimismo, aunque la primera fracción de aguas residuales recolectadas no mostraron diferencias en el contenido proteico, atendiendo al

tipo de extracción llevada a cabo (alcalina o ácida), sí se observaron diferencias cuando la segunda fracción de aguas residuales fue analizada, teniendo un mayor contenido proteico las fracciones de agua derivadas de la extracción ácida, en comparación con la extracción alcalina. En este sentido, la extracción ácida ha sido descrita como un proceso menos eficiente, causando una menor degradación de la pared celular, lo que conduce a una baja difusión de las proteínas al medio ácido. Asimismo, el pH alcanzado durante la solubilización de las proteínas en medio ácido (pH 2.5) está más cerca de su punto isoeléctrico, en comparación con el pH ajustado en la extracción alcalina (pH 9.5), lo que podría dar como resultado una solubilidad más baja de las proteínas en la primera etapa del proceso de extracción. En general, la extracción alcalina se ha descrito que tiene mayor rendimiento, aunque la extracción ácida podría ser preferible en ciertos casos debido a las diferentes propiedades tecnofuncionales de los extractos (Sari y col., 2013; Pojić y col., 2018). Sin embargo, en contraposición con los estudios publicados, los extractos proteicos han sido analizados previamente por el Departamento de Agricultura y Alimentos (Research Institutes of Sweden), con el que se ha colaborado para llevar a cabo este estudio, mostrando que los aislados de guisante (pH 2.5, 99.5% peso seco; pH 9.0, 93% peso seco) tenían un mayor contenido proteico en comparación con los aislados de haba (pH 2.5, 88.9% peso seco; pH 9.0, 82,3% peso seco). Además, ambos aislados mostraron una mayor pureza proteica en condiciones ácidas. En relación a esto, se han descrito diversas tecnologías, las cuales se podrían aplicar en la recuperación de las fracciones proteicas que quedan en las aguas residuales tras el proceso de extracción. Entre éstas, destaca la aplicación de procesos de adsorción, procesos de membrana como la ultrafiltración o el fraccionamiento de espuma, que han sido previamente descritos para la recuperación de proteínas de la soja de aguas residuales de la industria alimentaria.

Asimismo, Kurup y col., (2019) utilizaron el lignosulfonato de sodio para la recuperación de lípidos y proteínas de las aguas residuales provenientes de la industria láctea.

Se determinó también la presencia de carbohidratos en las aguas recolectadas tras la extracción proteica. Sin embargo, entre los cuatro carbohidratos analizados (sacarosa, fructosa, glucosa y galactosa), sólo la sacarosa fue identificada y cuantificada, ya que el resto de azúcares o bien no estaban presentes en las fracciones de agua analizadas o estaban por debajo del LoD del método analítico. Los resultados mostraron que el contenido en sacarosa en las primeras fracciones de las aguas recolectadas fue alrededor de un 82-92% mayor, en comparación con las fracciones recolectadas en la segunda etapa de extracción. Asimismo, también se observaron diferencias en función del tipo de extracción y de la matriz utilizada. Kontos y col. (2018), estudiaron metodologías para la recuperación y purificación de compuestos fenólicos de carbohidratos en aguas residuales provenientes de una almazara, mostrando utilidad de las membranas de nanofiltración para la separación de ambos compuestos, separando aproximadamente el 95% de la sacarosa del tirosol. Estos autores recomendaron aplicar una secuencia de tecnologías posteriores como la destilación al vacío, congelación, secado y cristalización por fusión, para recuperar estos compuestos de alto valor añadido.

En cuanto al contenido en compuestos fenólicos, las primeras fracciones de aguas residuales derivadas del aislamiento proteico de la harina del haba son las que mostraron un contenido mayor, así como una mayor capacidad antioxidante, siendo esta fracción la más apropiada para la potencial revalorización de estos compuestos bioactivos. Asimismo, debido a que, en ambas matrices, las primeras fracciones de aguas residuales son las que presentaron un mayor contenido en polifenoles totales, tanto la identificación y cuantificación de los polifenoles individuales y la determinación de la capacidad antioxidante, se realizó únicamente en estas fracciones. Así, en las fracciones de agua

recogidas de la extracción del haba se identificaron y cuantificaron dos flavonoides. Sin embargo, los cromatogramas analizados mostraron picos muy juntos y con baja intensidad, haciendo difícil la identificación y cuantificación del resto de compuestos fenólicos. En cambio, los cromatogramas resultantes del análisis de las primeras fracciones de aguas residuales procedentes del aislado proteico del guisante mostraron picos más separados y con una señal más intensa, mejorando la identificación y cuantificación de éstos. En estas aguas se pudieron identificar y cuantificar diversos flavonoides y ácidos fenólicos. Los polifenoles son bien reconocidos por sus propiedades antioxidantes, así como su contribución a la prevención de enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Cassano y col., 2018). Por ello, resulta importante la recuperación de estos compuestos bioactivos como ingredientes de alto valor añadido, pero de bajo coste en el sentido que resultan de la extracción de subproductos de desecho potencialmente valorizables. Asimismo, sus propiedades antioxidantes hacen que estos compuestos sean relevantes para su utilización en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y biotecnológica. En este sentido, se han descrito diversas metodologías para la recuperación de estos compuestos bioactivos. Entre ellas, destacan las tecnologías de membrana basadas en una combinación de ultrafiltración y ósmosis inversa para recuperar isoflavonas de la leche de soja (Xu y col., 2004). Asimismo, Conidi y col. (2012), también utilizaron una tecnología de membrana basada en la nanofiltración para la recuperación de flavonoides y su separación de los azúcares, aunque probando diferentes cortes de pesos moleculares y utilizando un material polimérico, obteniendo rendimientos entre el 70-89%, en una matriz de licor de la piel de naranja. Liu y col. (2015), describieron sistemas más complejos para la separación de agliconas de isoflavonas utilizando fraccionamiento de espuma seguido de una hidrólisis ácida y adsorción con microesferas de quitosano en

aguas residuales de suero de soja. Asimismo, Ochando-Pulido y Martínez-Férez (2018), desarrollaron un método basado en la combinación de procesos de membrana y centrifugación, mediante micro/ultra/nanocentrifugación, con la finalidad de recuperar y concentrar compuestos fenólicos presentes en las aguas residuales de una almazara. Del mismo modo, Castro-Muñoz y col. (2019), en su revisión sobre tecnologías basadas en membranas para la recuperación de compuestos biológicamente activos de alimentos y sus derivados, establece que las operaciones de membrana como la ultrafiltración y la nanofiltración han demostrado su efectividad en la recuperación, separación y fraccionamiento de compuestos fenólicos de diferentes fuentes agroalimentarias, mostrando estas tecnologías una clara aplicabilidad a nivel industrial y además siendo ambientalmente sostenibles, y no requiriendo la utilización de compuestos químicos. Asimismo, también establece que la futura investigación y desarrollo se enfoque hacia nuevas implementaciones de las tecnologías basadas en la nanofiltración, como principal herramienta para la recuperación y concentración de compuestos fenólicos. En definitiva, y teniendo en cuenta los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral, resulta evidente el potencial valor de las aguas residuales provenientes de la extracción de proteína vegetal. La pérdida de estos compuestos de alto valor añadido es un problema en este tipo de industrias y para solucionarlo es necesario investigar en tecnologías adecuadas para su recuperación, siempre atendiendo a las características específicas de las aguas generadas. La recuperación de los compuestos bioactivos, para posteriormente desarrollar productos de alto valor añadido, contribuiría a la optimización del proceso, así como a la reducción del impacto ambiental de las aguas generadas (Chen y col., 2019).

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES

En la situación actual, resulta evidente la gran preocupación existente acerca de las reservas de recursos hídricos de agua dulce disponibles. Factores como el cambio climático, la sucesión de fenómenos meteorológicos extremos o el aumento de la temperatura media, repercute directamente en el número de regiones que se enfrentan a problemas de escasez de agua. Todo esto se une al aumento de la población mundial, lo que provoca una mayor demanda de alimentos y la expansión de la industria agroalimentaria. El agua representa un recurso esencial para la industria agroalimentaria y la producción de alimentos, desde el empleo directo de agua para el riego agrícola hasta la utilización de grandes cantidades de agua en las distintas etapas de procesado, conservación y comercialización, siendo el elevado consumo de agua y la generación de aguas residuales uno de los principales problemas del sector agroalimentario. Por tanto, resulta imprescindible la gestión sostenible de los recursos hídricos en los diferentes sectores de la industria agroalimentaria, atendiendo a un modelo de economía circular, mediante prácticas seguras que eviten los riesgos microbiológicos y químicos. Como ejemplo, en el caso concreto de los alimentos vegetales, la acumulación de subproductos de desinfección (DBPs) durante la producción y procesado supone un gran riesgo que se debe de minimizar para preservar la salud pública.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha consistido en el estudio de prácticas relacionadas, directa o indirectamente, con la gestión y reutilización de las aguas en el sector agroalimentario. En el sector hortofrutícola, el uso de grandes volúmenes de agua para la etapa de lavado de frutas y hortalizas, hace necesario la implementación de tratamientos de desinfección capaces de mantener la calidad microbiológica del agua para que pueda reutilizarse, previniendo el riesgo de contaminación cruzada del producto vegetal lavado. Las aportaciones de esta Tesis se centran, en primer lugar, en la selección de metodologías de análisis y sensores para la monitorización de la concentración residual

de desinfectante, como principal parámetro de control de la desinfección. También mediante el estudio de la materia orgánica aportada por el producto vegetal al agua de lavado, la posible relación entre la concentración residual de desinfectante y el potencial de oxidación-reducción (ORP), y la determinación del rango de pH para que la actividad antimicrobiana del desinfectante sea máxima, siendo la primera vez que se comparan cuatro reguladores de pH empleados para tal fin. Asimismo, se ha profundizado sobre el riesgo químico asociado a la formación y acumulación de DBPs, debido al uso de desinfectantes clorados con el fin de mantener la calidad microbiológica del agua, y su posible captación por el producto vegetal. Ha sido posible el desarrollo y la validación de una metodología para el análisis de ácidos haloacéticos (HAAs) y su posterior verificación en muestras comerciales de una empresa de procesado. Se ha conseguido monitorizar la formación y acumulación de trihalometanos (THMs), HAAs y clorato utilizando un sistema dinámico, que simula un tanque de lavado de una planta comercial. Este modelo también ha permitido determinar el papel de los reguladores de pH en la formación de estos DBPs. Igualmente, esta monitorización de DBPs se aplicó a la reutilización de aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y destinadas al riego agrícola, para promover su reutilización, seleccionando aquellas tecnologías de desinfección que prevengan el riesgo químico de formación de DBPs y su posterior acumulación en los vegetales. Por último, teniendo en cuenta el gran consumo y generación de aguas residuales en los procesos industriales que producen aislados de proteínas, por primera vez se caracterizaron estas aguas, para su reutilización y como fuente de obtención de subproductos de valor añadido.

En base a los objetivos fijados, los resultados derivados de la presente Tesis Doctoral han permitido obtener las siguientes conclusiones:

- **Estudio comparativo de diferentes sensores comerciales y métodos analíticos de medida para la dosificación de los desinfectantes ácido peracético (PAA) y cloro (hipoclorito de sodio, NaOCl) empleados en la etapa de lavado.** Resulta necesaria una efectiva monitorización del desinfectante con el fin de mantener una adecuada concentración residual para reducir el riesgo de contaminación en el agua de lavado. Existen muchos métodos analíticos que permiten determinar la concentración de los desinfectantes, pero es necesario seleccionar el más adecuado, dependiendo de cada tipo de producto y desinfectante utilizado. De entre todas las metodologías comparadas para la monitorización de PAA (kit de valoración, reflectometría, sensor cronoamperométrico y sensor amperométrico) en las distintas aguas de lavado estudiadas (manzana, tomate, pimiento y limón), es el sensor cronoamperométrico el que presenta la mayor exactitud para la cuantificación del PAA, no mostrando diferencias con el método de referencia (HPLC-DAD). Esta metodología es altamente selectiva para la monitorización de este desinfectante. No muestra interferencias relacionadas con el color, turbidez o la materia orgánica presentes en el agua de lavado, ni con otros agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se encuentra a una elevada concentración en la solución comercial de PAA. Aunque el sensor amperométrico permite la monitorización en continuo y es un método adecuado para el control del PAA en la mayoría de las aguas de lavado, éste muestra interferencias muy pronunciadas con compuestos presentes en el agua que pueden proceder de la piel y de los exudados del limón. Asimismo, para la monitorización del cloro en aguas de lavado de productos cortados (lechuga iceberg, col lombarda, y repollo), el sensor amperométrico tampoco resulta una metodología fiable, mostrando grandes interferencias con la materia orgánica procedente de los exudados del corte de estos

productos. El resto de metodologías se muestran adecuadas para la determinación del cloro (método colorimétrico del DPD, método espectrofotométrico del DPD, método amperométrico de titulación, método reflectométrico y sensor cronoamperométrico), aunque el método cronoamperométrico es el más sencillo y rápido para la monitorización “in situ” de los niveles de cloro en las líneas comerciales de productos vegetales. Tras el estudio de los parámetros de control de la desinfección con cloro, se concluye que el valor del potencial de oxidación-reducción (ORP) no es un parámetro adecuado para ser utilizado en la monitorización de la concentración de cloro libre presente en el agua de lavado.

- **Optimización y validación de una metodología adecuada para la detección y cuantificación de subproductos de desinfección (DBPs), ácidos haloacéticos (HAAs), en producto vegetal fresco cortado y en su agua de lavado.** La metodología desarrollada para el análisis de los 9 HAAs en producto vegetal fresco y en agua de lavado es adecuada y efectiva. Así lo muestran los parámetros utilizados para el proceso de validación (selectividad, especificidad, evaluación de la curva de calibración y linealidad, LoQ, LoD, evaluación del efecto matriz, exactitud y estabilidad), que cumplen perfectamente los criterios establecidos por la guía SANTE (SANTE, 2019). Esta metodología, basada en la determinación de estos subproductos mediante UHPLC-MRM, resulta mucho más sencilla y rápida que las publicadas previamente, especialmente para producto vegetal. Sin embargo, el material vegetal resulta altamente complejo, afectando a la capacidad de detección de algunos HAAs. Por este motivo, estrategias como la utilización de curvas de calibración en matriz e incluso con adición estándar, son necesarias para compensar los efectos de la matriz cuando se presenten dichas interferencias. Por

último, la verificación de la metodología en muestras comerciales de una industria de procesado en IV gama demuestra la aplicabilidad e idoneidad del método validado, confirmando la presencia en la industria de valores relativamente elevados de algunos de los HAAs. Este hecho muestra la utilidad de la metodología validada para el estudio del comportamiento de los HAAs en el agua de lavado y su absorción por el producto vegetal. En un futuro, y gracias a la recopilación de datos fiables obtenidos en la industria, se podrá llevar a cabo una evaluación del riesgo asociado a la presencia de estos DBPs en los productos vegetales, que pueda servir como posible punto de partida para una regulación del nivel máximo residual de HAAs en estos alimentos.

- **Influencia de los reguladores de pH empleados en la desinfección con cloro en la generación de cloro gas (Cl_2) y en la formación de subproductos de desinfección (DBPs): cambios en las características físico-químicas y microbiológicas del agua de lavado.** En la desinfección con cloro, se establece el rango de pH 5.0-6.0 para todos los reguladores de pH (ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido carbónico). En este rango de pH, la especie con mayor capacidad antimicrobiana (ácido hipocloroso, HOCl) se encuentra en su concentración máxima (>90%). Asimismo, se demuestra en agua de lavado de lechuga clorada con hipoclorito sódico, que los distintos reguladores de pH no afectan a la capacidad bactericida del desinfectante ni a las características físico-químicas del agua. En la industria de procesado, el ácido cítrico se emplea habitualmente como regulador de pH en la desinfección con cloro. Sin embargo, se establecen grandes desventajas en el empleo de este ácido, como es la reducción del cloro libre en favor de la posible formación de cloro gas (Cl_2), siendo ésta una

especie nociva para los trabajadores presentes en la línea de procesado. Asimismo, se intuye que la formación de Cl_2 podría ser mayor en función del nivel inicial de cloro, el nivel de pH o la cantidad de ácido cítrico añadida para regular el pH. Igualmente, se demuestra que el ácido cítrico contribuye en mayor medida en la formación de trihalometanos (THMs) en el agua de lavado, por lo que su formación no es deseable. El ácido fosfórico resulta el más adecuado de entre todos los reguladores de pH evaluados. Este ácido presenta diversas ventajas frente al resto, como su amplio rango de pH (3.0-6.0) para alcanzar la máxima concentración de HOCl (comparado con ácido cítrico y carbónico), su naturaleza inorgánica que limita la formación de THMs (comparado con ácido cítrico), y su carácter débil resultando menos corrosivo y más apropiado para el correcto mantenimiento de las instalaciones de una planta de procesado (comparado con ácido sulfúrico). Por último, las altas concentraciones de THMs, HAAs y clorato alcanzadas en el agua de lavado de este estudio, demuestran el riesgo de formación y acumulación de DBPs durante las operaciones de lavado en la industria de procesado.

- **Estudio de la influencia de los tratamientos terciarios de desinfección con cloro, ácido peracético (PAA), UV, cloro/UV y PAA/UV en la formación de subproductos de desinfección, DBPs (trihalometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs) y clorato) en aguas regeneradas procedentes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y destinadas al riego agrícola.** La monitorización de DBPs en 15 EDARs a gran escala de la Región de Murcia establece que la desinfección con cloro o su combinación con UV aumenta significativamente los niveles de THMs, HAAs y clorato en los efluentes tratados, independientemente de las características físico-químicas de las aguas. Se

demuestra el riesgo que puede implicar la utilización de aguas regeneradas cloradas para el riego agrícola, debido a la posible acumulación de DBPs en los cultivos, especialmente en el caso de clorato. La absorción de clorato durante el riego ha sido previamente estudiada, pudiendo sobrepasar el límite máximo residual establecido por la Unión Europea para productos vegetales. El estudio llevado a cabo muestra la importancia de monitorizar los DBPs en las EDARs que utilizan tratamientos clorados de desinfección con vistas a hacer una evaluación de riesgos para establecer los límites máximos de los DBPs en las aguas regeneradas y destinadas al uso agrícola. Igualmente, se ha demostrado que cuando las EDARs cambian a tratamientos de desinfección basados en PAA, UV o la combinación de ambos, la presencia de los DBPs disminuye considerablemente. Esto pone en evidencia los beneficios del PAA, UV o PAA/UV como alternativa al cloro para su implementación en el tratamiento de las aguas regeneradas, siempre que se mantenga la seguridad microbiológica de los efluentes. Al realizarse este estudio a lo largo de la pandemia de COVID-19, fue necesario tratar las muestras de influentes para garantizar la completa inactivación del virus SARS-CoV-2, ya que se iban a manipular en un laboratorio de análisis químico y no de bioseguridad. El análisis de las muestras inactivadas demostró que los dos métodos de inactivación utilizados causan interferencias en la determinación de THMs y HAAs, por lo que únicamente se ha monitorizado la presencia de clorato en los influentes de las 15 EDARs. Los altos niveles de clorato detectados en algunos de los influentes, probablemente derivados del excesivo uso de desinfectantes clorados por la población durante la pandemia, enfatizan la importancia de seleccionar tecnologías de desinfección que no generen DBPs.

- **Estudio de la caracterización de las aguas de proceso derivadas de la obtención de proteína vegetal y de su tratamiento con el fin de revalorizar su aprovechamiento y de reducir el impacto del vertido al medio ambiente.** Todas las fracciones de agua recogidas tras la extracción proteica de harina de haba y guisante muestran un alto contenido en materia orgánica, presentando un potencial impacto medioambiental en caso de vertido, especialmente la primera fracción de aguas. Se demuestra la necesidad de tratamiento de estas aguas antes de su vertido. Para ello, se sugiere la aplicación de tecnologías de membrana tales como nanofiltración u ósmosis inversa, centradas en la retención de los compuestos solubles, que representan la materia orgánica mayoritaria de estas aguas. Se propone la utilización de estas tecnologías de membrana actuando en serie con un pretratamiento mediante micro o ultrafiltración, para la retención previa de los sólidos en suspensión. Asimismo, también se sugiere la recuperación de los principales compuestos de valor añadido (proteínas, azúcares y polifenoles), presentes mayoritariamente en la primera fracción de estas aguas. Los polifenoles constituyen la fracción más relevante debido a sus propiedades antioxidantes, sus beneficios para la salud y su posible utilización como ingredientes bioactivos para la industria alimentaria. En el estudio llevado a cabo, las primeras fracciones de aguas derivadas del aislamiento proteico de la harina de haba son las que muestran un contenido mayor en fenoles totales, así como una mayor capacidad antioxidante. Esta fracción resulta la más apropiada para la potencial revalorización de estos compuestos bioactivos. Aunque es necesario profundizar e investigar en las tecnologías adecuadas, atendiendo a las características específicas de las aguas generadas, se proponen tecnologías de membrana, a veces combinadas con otros

procesos físico-químicos, para la recuperación y concentración de estos compuestos bioactivos.

REFERENCIAS

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123 (1-2), 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>.
- Abd El-Halim, M.I., Mohammed, S.Y., Idris, O.F., Sabahelkhier, M.K. (2017). Histopathological effect on different rat tissues induced by the trihalomethanechloroform administered in drinking water. *International Journal of Advanced Research*. 3 (11), 1319-1329.
- Abu-Reidah, I.M., Contreras, M.M., Arráez- Román, D., Fernández-Gutiérrez, A. (2014). UHPLCESI- QTOF-MS-based metabolic profiling of *Vicia faba* L. (Fabaceae) seeds as a key strategy for characterization in foodomics. *Electrophoresis*, 35, 1571-1581 <https://doi.org/10.1002/elps.201300646>.
- Adam, L.C., Gordon, G. (1999). Hypochlorite ion decomposition: Effects of temperature, ionic strength, and chloride ion. *Inorganic Chemistry*, 38 (6), 1299-1304. <https://doi.org/10.1021/ic980020q>.
- AECOSAN-2016-002. (2016). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación al uso de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno, ácido acético y ácido peracético (23/17/15) como coadyuvante tecnológico para la desinfección bacteriana de cítricos y tomates y el agua de lavado de los mismos. Revista del comité científico nº 23. pp. 21-43. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_cc_ingles/CITROCIDE_PLUS.pdf.
- AFHORLA. (2010). Asociación Española de Fabricantes de Frutas y Hortalizas Lavadas Listas para su Empleo. Guía de buenas prácticas de producción de IV Gama.

- http://www2.fepex.es/archivos/publico/GuiaBuenasPracticas_IV_Gama_ver2.pdf
f.
- AHDB. (2016). Agriculture and Horticulture Development Board. Chlorine and its oxides; Chlorate and perchlorate review. https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Research%20Papers/Horticulture/CP%20154a_Report_Final_2016.pdf.
- Ahvenainen, R. (2000). *Ready-to-use fruit and vegetables. Flair-flow Europe Technical Manual F-FE 376A/00*, Teagasc, The National Food Centre. http://old.vscht.cz/flairflow4/Fru_veget00.pdf.
- Aivazidou, E., Tsolakis, N., Iakovou, E., Vlachos, D. (2016). The emerging role of water footprint in supply chain management: A critical literature synthesis and a hierarchical decision-making framework. *Journal of Cleaner Production*, 137, 1018-1037. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.210>.
- Alcalde-Sanz, L., Gawlik, B.M. (2017). *Minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge—towards a legal instrument on water reuse at EU level*. EUR 28962 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-77175-0. https://www.unisdr.org/preventionweb/files/56986_jrc109291online.pdf.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050—the 2012 revision. ESA working paper n° 12-03. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.288998>.
- Alexandrou, L.D., Bowen, C., Jones, O.A.H. (2019). Fast analysis of multiple haloacetic acids and nitrosamines in recycled and environmental waters using liquid chromatography-mass spectrometry with positive–negative switching and

- multiple reaction monitoring. *Analytical Methods*, 30, 11, 3793-3799.
<https://doi.org/10.1039/c9ay01276a>.
- Alexandrou, L.D, Meehan, B., Morrison, P., Jones, O. (2017). A new method for the fast analysis of trihalomethanes in tap and recycledwaters using headspace gas chromatography with micro-electron capture detection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 527.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14050527>.
- Alfredo, K., Stanford, B., Roberson, J.A., Eaton, A. (2015). Chlorate challenges for water systems. *Journal of American Water Works Association*, 107 (4), 187-196.
<https://doi.org/10.5942/jawwa.2015.107.0036>.
- Ali, A., Yeoh, W.K., Forney, C., Siddiqui, M.W. (2018). Advances in postharvest technologies to extend the storage life of minimally processed fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (15), 2632-2649.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1339180>.
- Allan, J.A. (1993). Fortunately, there are substitutes for water otherwise our hydro-political futures would be impossible. Priorities for water resources allocation and management, ODA, London, 13-26.
- Allard, S., Charrois, J.W.A., Joll, C.A., Heitz, A. (2012). Simultaneous analysis of 10 trihalomethanes at nanogram per liter levels in water using solid-phase microextraction and gas chromatography mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1238, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.020>.
- Allen, J.M., Cuthbertson, A.A., Liberatore, H.K., Kimura, S.Y., Mantha, A., Edwards, M.A., Richardson, S.D. (2017). Showering in Flint, MI: is there a DBP problem? *Journal of Environmental Science*, 58, 271-284.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.06.009>.

- Allende, A., McEvoy, J.L., Luo, Y., Artes, F., Wang, C.Y. (2006). Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed “Red Oak Leaf” lettuce. *Food Microbiology*, 23, 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.009>.
- Al-Otoum, F., Al-Ghouti, M.A., Ahmed, T.A., Abu-Dieyeh, M., Ali, M. (2016). Disinfection by-products of chlorine dioxide (chlorite, chlorate, and trihalomethanes): occurrence in drinking water in Qatar. *Chemosphere* 164, 649-656. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.008>.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B. (2008). Legumes as a source of natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 855-878. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800114>.
- Amy, G.L., Tan, L., Davis, M.K. (1991). The effects of ozonation and activated carbon adsorption on trihalomethane speciation. *Water Research*, 25, 191-202, [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90029-P](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90029-P).
- Anastassiades, M., Kolberg, D.I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Wachtler, A.-K., Zechmann, S. Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G. (2021). *Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method) I. Food of plant origin (QuPPE-PO-Method)*. EU reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (EURL-SRM), version 10. https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf.
- Ao, X., Eloranta, J., Huang, C.H., Santoro, D., Sun, W., Lu, Z., Li, C. (2021). Peracetic acid-based advanced oxidation processes for decontamination and disinfection of

- water: A review. *Water Research*, 188, 116479.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116479>.
- APHA. (2014). American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water* (21.^a Ed.). American Public Health Association, Washington, DC.
- Artés, F., Allende, A. (2014). Minimal processing of fresh fruit, vegetables, and juices. En Sun, D.W. (Ed.). *Emerging Technologies for Food Processing*. pp. 583-597. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012676757-5/50028-1>.
- Asgharnejad, H., Nazloo, E.K., Larijani, M.M., Hajinajaf, N., Rashidi, H. (2021). Comprehensive review of water management and wastewater treatment in food processing industries in the framework of water-food-environment nexus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1-37.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12782>.
- Assatory, A., Vitelli, M., Rajabzadeh, A.R., Legge, R.L. (2019). Dry fractionation methods for plant protein, starch and fiber enrichment: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 340-351. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.006>.
- Baginsky, C., Peña-Neira, A., Cáceres, A., Hernández, T., Estrella, I., Morales, H., Pertuzé, R. (2013). Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31 (1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.02.003>.
- Bai, M., Tian, Y., Yu, Y., Zheng, Q., Zhang, X., Zheng, W., Zhang, Z. (2018). Application of a hydroxyl-radical-based disinfection system for ballast water. *Chemosphere*, 208, 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.010>.
- Bain, W., Lee, J.S., Watson, A.M., Stitt-Fischer, M.S. (2020). Practical guidelines for collection, manipulation and inactivation of SARS-CoV-2 and COVID-19 clinical

- specimens. *Current Protocols in Cytometry* 93, 77.
<https://doi.org/10.1002/cpcy.77>.
- Baldry, M.G.C. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54, 417-423.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02637.x>.
- Bao Loan, H.N., Kerkaert, B., Cucu, T., Mestdagh, F., de Meulenaer, B. (2016). 3-chlorotyrosine formation versus other molecular changes induced by hypochlorous acid in proteins: A study using dairy proteins as a model. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 145-152.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.062>.
- Barać, M.B., Pešić, M.B., Stanojević, S.P., Kostić, A.Z., Čabrilo, S.B. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates: A review. *Acta Periodica Technologica*, 46, 1-18. <https://doi.org/10.2298/APT1546001B>.
- Barceló, D., López, M.J. (2007). *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. En: Panel científico- técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC.
https://fnca.eu/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf.
- Barth, M., Hankinson, T.R., Zhuang, H., Breidt, F. (2010). Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. En Sperber, W., Doyle, M. (Eds). *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Food Microbiology and Food Safety*. pp. 135-183. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_6.
- Baumgartner, J.C., Ibay, A.C. (1987). The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *Journal of Endodontics*, 13, (2), 132-135.
[https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(87\)80153-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(87)80153-X).

- Beber de Souza, J., Queiroz-Valdez, F., Jeranoski, R.F., de Souza Vidal, C.M., Cavallini, G.S. (2015). Water and wastewater disinfection with peracetic acid and UV radiation and using advanced oxidative process PAA/UV. *International Journal of Photoenergy*, 860845, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/860845>.
- Benson, N.U., Akintokun, O.A., Adedapo, A.E. (2017). Disinfection byproducts in drinking water and evaluation of potential health risks of long-term exposure in Nigeria. *Journal of Environmental and Public Health*, 2017, 7535797. <https://doi.org/10.1155/2017/7535797>.
- Bermejo, F.J., Ayuso, M., Morales, A.B. (2021). Problemática asociada a la presencia subproductos de desinfección en aguas depuradas, productos agrícolas y sus transformados. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y la Alimentación*, 75, 12-17. <https://ctnc.es/wp-content/uploads/2022/05/Articulo-CTC-75.pdf>.
- Bernstein, A., Siebner, H., Kaufman, A.G., Gross, A. (2021). Onsite chlorination of greywater in a vertical flow constructed wetland—significance of trihalomethane formation. *Water*, 13, 903. <https://doi.org/10.3390/w13070903>.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59 (2), 204-216. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.204>.
- BOE. (2001). Boletín Oficial del Estado. Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. Núm. 176, pp. 26791-26817. <https://www.boe.es/boe/dias/2001/07/24/pdfs/A26791-26817.pdf>.
- BOE. (2003a). Boletín Oficial del Estado. Ley 62/2003, de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y del orden social. Núm. 313, pp. 46874-46992. <https://www.boe.es/eli/es/l/2003/12/30/62/dof/spa/pdf>.

- BOE. (2003b). Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Núm. 45, pp. 7228-7245. <https://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>.
- BOE. (2007a). Boletín Oficial del Estado. Real Decreto-ley 4/2007, de 13 de abril, por el que se modifica el texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por el Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio. Núm. 90, pp. 16450-16451. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/04/14/pdfs/A16450-16451.pdf>.
- BOE. (2007b). Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. Núm. 294, pp. 50639-50661. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>.
- Bond, T., Goslan, E.H., Parsons, S.A., Jefferson, B. (2012). A critical review of trihalomethane and haloacetic acid formation from natural organic matter surrogates, *Environmental Technology Reviews*, 1, (1), 93-113. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.705895>.
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S.H. (2010b). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43 (2), 537-546. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>.
- Boye, J.I., Zare, F., Pletch, A. (2010a). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2), 414-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 28, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.008>.
- Bruzzoniti, M.C., Rivoira, L., Meucci, L., Fungi, M., Bocina, M., Binetti, R., Castiglioni, M. (2019). Towards the revision of the drinking water directive 98/83/EC. Development of a direct injection ion chromatographic-tandem mass spectrometric method for the monitoring of fifteen common and emerging disinfection by-products along the drinking water supply chain. *Journal of Chromatography A*, 1605, 360350. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.004>.
- Bueno, S., del Cancho, C., García, M., Garrido, R., Saorín, J. (2020). *Guía práctica para la depuración de aguas residuales en la industria alimentaria*. Agrupación de Industrias Alimentarias de Murcia, Alicante y Albacete, AGRUPAL. Entidad de Saneamiento y Depuración de Aguas Residuales de la Región de Murcia, ESAMUR. https://www.esamur.com/dmdocuments/agrupal_esamur_depuracion%20aguas.pdf.
- Bulman, D.M., Remucal, C.K. (2020). Role of reactive halogen species in disinfection byproduct formation during chlorine photolysis. *Environmental Science and Technology*, 54, 9629-9639. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c02039>.
- Buxton, G.V., Subhani, M.S. (1972). Radiation chemistry and photochemistry of oxychlorine ions. Part 1.-Radiolysis of aqueous solutions of hypochlorite and

- chlorite ions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 68 (5), 947-957.
- Caban, M., Migowska, N., Stepnowski, P., Kwiatkowski, M., Kumirska, J. (2012). Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1258, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.029>.
- Cantor, K.P., Villanueva, C.M., Silverman, D.T., Figueroa, J.D., Real, F.X., Garcia-Closas, M., Garcia-Closas, R. (2010). Polymorphisms in GSTT1, GSTZ1, and CYP2E1, disinfection by-products, and risk of bladder cancer in Spain. *Environmental Health Perspectives*, 118 (11), 1545-1550. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002206>.
- Cardador, M.J., Gallego, M. (2012). Effect of the chlorinated washing of minimally processed vegetables on the generation of haloacetic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7326-7332. <https://doi.org/10.1021/jf302591u>.
- Cardador, M.J., Gallego, M. (2014). Eco-friendly microextraction method for the quantitative speciation of 13 haloacetic acids in water. *Journal of Chromatography A*, 1340, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.019>.
- Casani, S., Knøchel, S. (2002). Application of HACCP to water reuse in the food industry. *Food Control*, 13, 315-327. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00037-3](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00037-3).
- Casani, S., Rouhany, M., Knøchel, S. (2005). A discussion paper on challenges and limitations to water reuse and hygiene in the food industry. *Water Research*, 39 (6), 1134-46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.015>.

- Cassano, A., Conidi, C., Ruby-Figueroa, R., Castro-Muñoz, R. (2018). Nanofiltration and tight ultrafiltration membranes for the recovery of polyphenols from agro-food by-products. *International Journal of Molecular Science*, 19, 351. <https://doi.org/10.3390/ijms19020351>.
- Castro-Muñoz, R., Conidi, C., Cassano, A. (2019). Membrane-based technologies for meeting the recovery of biologically active compounds from foods and their by-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (18), 2927-2948. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1478796>.
- Cavallini, G.S., de Campos, S.X., de Souza, J.B., de Sousa Vidal, C.M. (2013). Comparison of the methodologies for determination of residual peracetic acid in wastewater disinfection. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93, 906-918. <https://doi.org/10.1080/03067319.2012.702274>.
- CDC. (2018). Centers for Disease Control and Prevention. Chlorine. Acceso el 30 de marzo de 2022 en <https://emergency.cdc.gov/agent/chlorine/basics/facts.asp#:~:text=Chlorine%20gas%20can%20be%20recognized,people%20that%20they%20are%20exposed.&text=Chlorine%20itself%20is%20not%20flammable,such%20as%20turpentine%20and%20ammonia>.
- Chaidez, C., Castro-del Campo, N., Basilio-Heredia, J., Contreras-Angulos, L., González-Aguilar, G., Ayala-Zavala, J.F. (2012). Chlorine. En Gómez-López, V.M. (eds.) *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. pp. 89-101. Wiley & Sons, Inc.
- Charles, L., Pépin, D. (1998). Analysis of oxyhalides in water by ion chromatography-spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 24, 804 (1-2), 105-11. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)01244-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)01244-2).

- Chaukura, N., Marais, S.S., Moyo, W., Mbali, N., Thakalekoala, L.C., Ingwani, T., Mamba, B.B., Jarvis, P., Nkambule, T.T.I. (2020). Contemporary issues on the occurrence and removal of disinfection byproducts in drinking water - a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8, 103659, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103659>.
- Chaves, R.S., Guerreiro, C.S., Cardoso, V.V., Benoliel, M.J., Santos, M.M. (2019). Review Hazard and mode of action of disinfection by-products (DBPs) in water for human consumption: evidences and research priorities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.*, 223, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.05.015>.
- Chen, X., Hung, Y.C. (2016). Predicting chlorine demand of fresh and fresh-cut produce based on produce wash water properties. *Postharvest Biology and Technology*, 120, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.007>.
- Chen, H., Zhang, H., Tian, J., Shi, J., Linhardt, R.J., Ye, T.D.X., Chen, S. (2019). Recovery of high value-added nutrients from fruit and vegetable industrial wastewater. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1388-1402. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12477>.
- Chisholm, K., Cook, A., Bower, C., Weinstein, P. (2008). Risk of birth defects in Australian communities with high levels of brominated disinfection by-products. *Environmental Health Perspectives*, 116, 1267-1273, <https://doi.org/10.1289/ehp.10980>.
- Chowdhury, S., Champagne, P., McLellan, P.J. (2009). Models for predicting disinfection byproduct (DBP) formation in drinking waters: a chronological review. *Science of the Total Environment*, 407, 4189-4206. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.006>.

- Chowdhury, S., Rodriguez, M.J., Sadiq, R. (2011). Disinfection byproducts in Canadian provinces: associated cancer risks and medical expenses. *Journal of Hazardous Materials*, 187, (1-3), 574-584. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.085>.
- Colantoni, A., Recchia, L., Bernabei, G., Cardarelli, M., Roupheal, Y., Colla, G. (2017). Analyzing the environmental impact of chemically-produced protein hydrolysate from leather waste vs. enzymatically-produced protein hydrolysate from legume grains. *Agriculture*, 7, (8), 62. <https://doi.org/10.3390/agriculture7080062>.
- Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Miino, M.C., Caccamo, F.M., Torretta, V., Rada, E.C., Sorlini, S. (2021). Disinfection of wastewater by UV-based treatment for reuse in a circular economy perspective. Where are we at? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 1-24. <https://doi.org/10.3390/ijerph18010077>.
- CAC. (1969). Comisión del Codex Alimentarius. Normas Internacionales de los Alimentos. Principios generales de higiene de los alimentos (CXC 1-1969). Revisado en 2020.
- Compton, M., Willis, S., Rezaie, B., Humes, K. (2018). Food processing industry energy and water consumption in the Pacific northwest. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 371-383. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.001>.
- Conidi, C., Cassano A, Drioli, E. (2012). Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 867-874. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.005>.
- Coroneo, V., Carraro, V., Marras, B., Marrucci, A., Succa, S., Meloni, B., Pinna, A., Angioni, A., Sanna, A., Schintu, M. (2017). Presence of trihalomethanes in ready-to-eat vegetables disinfected with chlorine. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34 (12), 2111-2117. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1382723>.

-
- Croué, J.-P., Korshin, G.V., Benjamin, M. (2000). *Characterization of Natural Organic Matter in Drinking Water*. AWWA Research Foundation.
- Cui, Q., Liu, H., Yang, H.-W., Lu, Y., Chen, Z., Hu, H.-Y. (2020). Bacterial removal performance and community changes during advanced treatment process: a case study at a full-scale water reclamation plant. *Science of the Total Environment*, 705, 135811. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135811>.
- Culea, M., Cozar, O., Ristoiu, D. (2006). Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water. *Journal of Mass Spectrometry*, 41 (12), 1594-1597. <https://doi.org/10.1002/jms.1149>.
- Darnell, M.E.R., Subbarao, K., Feinstone, S.M., Taylor, D.R. (2004). Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *Journal of Virological Methods*, 121, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.006>.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants – potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32 (1), 25-42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>.
- de Fraiture, C., Wichelns, D. (2010). Satisfying future water demands for agriculture. *Agricultural Water Management*, 97 (4), 502-511. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.08.008>.
- Deborde, M., von Gunten, U. (2008). Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment — Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*, 42, 13-51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.07.025>.
- Deng, L.Z., Mujumdar, A.S., Pan, Z., Vidyarthi, S.K. Xu, J., Zielinska, M. Xiao, H.W. (2020) Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and

- vegetables: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (15), 2481-2508. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1649633>.
- Denggerile, A., Awad, M. I., Okajima, T., Harnood, C., Ohsaka, T. (2004). Effect of electrode materials on the kinetics of the electro-reduction of peroxyacetic acid. *Electrochimica Acta*, 49, 4135-4141. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2004.04.007>.
- Desiderio, D.M., Nibbering, N.M.M. (2010). *White's handbook of chlorination and alternative disinfectants*. Hoboken, N.J. Wiley.
- Di Bernardo, J., Iosco, C., Rhoden, K. J. (2011). Intracellular anion fluorescence assay for sodium/iodide symporter substrates. *Analytical Biochemistry*, 415 (1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.017>.
- Diana, M., Felipe-Sotelo, M., Bond, T. (2019). Disinfection byproducts potentially responsible for the association between chlorinated drinking water and bladder cancer: a review. *Water Research*, 162, 492-504. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.014>.
- Diemert, S., Wang, W., Andrews, R.C., Li, X.F. (2013). Removal of halo-benzoquinone (emerging disinfection by-product) precursor material from three surface waters using coagulation. *Water Research*, 47 (5), 1773-1782.
- Ding, G., Zhang, X., Yang, M., Pan, Y. (2013). Formation of new brominated disinfection byproducts during chlorination of saline sewage effluents. *Water Research*, 47, 2710–2718. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.036>.
- Ding, S., Chu, W., Krasner, S.W., Yu, Y., Fang, C., Xu, B., Gao, N. (2018). The stability of chlorinated, brominated, and iodinated haloacetamides in drinking water. *Water Research*, 142, 490-500. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.024>.

- do Lago, C.L., Daniel, D. (2019). Determination of haloacetic acids in drinking water by LC/MS/MS. Agilent application note. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-haloacetic-acids-1290-infinity-ii-lc-5994-1275en-agilent.pdf>.
- Domínguez-Henao, L., Turolla, A., Antonelli, M. (2018a). Disinfection by-products formation and ecotoxicological effects of effluents treated with peracetic acid: A review. *Chemosphere*, 213, 25-40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.005>.
- Domínguez-Henao, L., Turolla, A., Monticelli, D., Antonelli, M. (2018b). Assessment of a colorimetric method for the measurement of low concentrations of peracetic acid and hydrogen peroxide in water. *Talanta*, 183, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.078>.
- Domínguez-Tello, A. (2017). *Desarrollo de métodos de análisis y control de subproductos de desinfección en aguas de abastecimiento público*. (Tesis doctoral). Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez Martín”, Universidad de Huelva. <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/14597>.
- Donabed, J.E. (2018). *Evaluation of the Palintest PAASense on the quantification of the peracetic acid*. Enviro Tech Chemical Services. Acceso el 20 de agosto de 2022 en <https://envirotech.com/wp-content/uploads/2019/02/PAASense-Validation-Report.pdf>.
- Dong, H., Qiang, Z., Richardson, S.D. (2019). Formation of iodinated disinfection byproducts (I-DBPs) in drinking water: emerging concerns and current issues. *Accounts of Chemical Research*, 52, 896-905. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00641>.

- Donnaz, S. (2020). Water reuse practices, solutions and trends at international. Chapter 3. En Verlicchi, P. (Ed.). *Wastewater Treatment and Reuse – Lessons Learned in Technological Developments and Management Issues*. pp. 65-102. *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management*, vol. 6. <https://doi.org/10.1016/bs.apmp.2020.07.012>.
- Du, Y., Lv, X.T., Wu, Q.Y., Zhang, D.Y., Zhou, Y.T., Peng, L., Hu, H.Y. (2017). Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: a review. *Journal of Environmental Science*, 58, 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.01.013>.
- Duan, J., Li, W., Si, J., and Mulcahy, D. (2011). Rapid determination of nine haloacetic acids in water using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in multiple reactions monitoring mode. *Analytical Methods*, 3, 1667-1673. <https://doi.org/10.1039/C1AY05122A>.
- Dupont, D., Renzetti, S. (1998). Water use in the Canadian food processing industry. *Canadian Journal of Agricultural Economics*, 46 (1), 83-92. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7976.1998.tb00083.x>.
- EC. (2017). Commission notice on guidance document on addressing microbiological risks in fresh fruits and vegetables at primary production through good hygiene. *Official Journal*, C 163, 1-40. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52017XC0523%2803%29>.
- ECETOC. (2001). Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología de Productos Químicos. *Peracetic acid (CAS No. 79-21-0) and its equilibrium solutions*. ISSN: 0733-6339-40 (Vol. 40). Acceso el 5 de mayo de 2022 en <http://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/JACC-040.pdf>.

- Edaal, T.T., Bernatek, I.S. (1963). Determination of organic peracids and hydrogen peroxide in mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 28, 322-326. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)87239-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)87239-6).
- Effkemann, S., Karst, U. (1998). Reagent for the high-performance liquid chromatography determination of peroxy-carboxylic acids. *Analyst*, 123, 1761-1755. <https://doi.org/10.1039/a801697f>.
- EFSA/ECDC. (2021). European Food Safety Agency and European Centre for Disease Prevention and Control. *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*. EFSA Journal 19(12), 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.
- Ehsani, N., Vörösmarty, C.J., Fekete, B.M., Stakhiv, E.Z. (2017). Reservoir operations under climate change: storage capacity options to mitigate risk. *Journal of Hydrology*, 555, 435-446. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2017.09.008>.
- Emmert, G.L., Geme, G., Brown, M.A., Simone Jr., P.S. (2009). A single automated instrument for monitoring total trihalomethane and total haloacetic acid concentrations in near real-time. *Analytica Chimica Acta*, 656, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.002>.
- Ercin, A.E., Hoekstra, A.Y. (2014). Water footprint scenarios for 2050: a global analysis. *Environment International*, 64, 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.019>.
- Ersan, M.S., Liu, C, Amy, G., Karanfil, T. (2019). The interplay between natural organic matter and bromide on bromine substitution. *Science of the Total Environment*, 646, 1172-1181. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.384>.
- EURACHEM/CITAC. (2012). *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, 3rd Edition. Acceso el 12 de mayo de 2022 en http://www.eurachem.org/images/stories/guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.

- EFSA. (2015). European Food Safety Authority. *Risks for public health related to the presence of chlorate in food*. EFSA Journal 13 (6), 4135. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2015.4135>.
- Fahim, R.J., Attia, E.Z., Kamel, M.S. (2019). The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 18, 73-198. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9586-9>.
- Fährnich, A., Mavrov, V., Chmiel, H. (1998). Membrane processes for water reuse in the food industry. *Desalination* 119 (1-3), 213-216. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(98\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(98)00158-1).
- Fan, X., Sokorai, K.J. (2015). Formation of trichloromethane in chlorinated water and fresh-cut produce and as a result of reaction with citric acid. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.009>.
- Fang, J., Ma, J., Yang, X., Shang, C. (2009). Formation of carbonaceous and nitrogenous disinfection by-products from the chlorination of *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, 44, 1934-1940. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.046>.
- FAO. (2009). Food and Agriculture Organization. *Alimentar al mundo, erradicar el hambre. Roma: Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria*. WSFS 2009/INF/2. <https://www.fao.org/3/k6077s/k6077s.pdf>.
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization. Escasez de agua: Uno de los mayores retos de nuestro tiempo. Acceso el 31 de marzo de 2022 en <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1185408>.
- FAO/WHO. (2021). Food and Agriculture Organization/World Health Organization. *Safety and quality of water used with fresh fruits and vegetables. Microbiological Risk Assessment Series*. No. 37. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb7678en>.

- Feretti, D., Zerbini, I., Ceretti, E., Villarini, M., Zani, C., Moretti, M., Fatigoni, C., Orizio, G., Donato, F., Monarca, S. (2008). Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. *Water Research*, 42, 4075e4082. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.018>.
- FDA. (1996). Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. Guidance for Industry Q2B validation of analytical procedures: Methodology. <https://www.fda.gov/media/71725/download>.
- Fischer, W., Arlt, E., Brabander, B. (1990). Method and reagent for the determination of peracids. U.S. Patent No. 4,900,682. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. <https://patentimages.storage.googleapis.com/13/b1/eb/fa684b466c16f5/US4900682A.pdf>.
- Flores, M.J., Brandi, R.J. Cassano, A.E., Labas, M.D. (2014). A novel approach to explain the inactivation mechanism of *Escherichia coli* employing a commercially available peracetic acid. *Water Science & Technology*, 69, 358-363. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.721>.
- Fundación Aquae. (2022). *¿Cuánta agua se necesita para producir alimentos?* Acceso el 30 de marzo de 2022 en <https://www.fundacionaquae.org/cuanta-agua-se-necesita-para-producir-alimentos>.
- Furia, F.D., Prato, M., Quintily, U., Salvagno, S., Scorrano, G. (1984). Gas-liquid chromatographic method for the determination of peracids in the presence of a large excess of hydrogen peroxide. *Analyst*, 109, 985–987. <https://doi.org/10.1039/AN9840900985>.
- Gallego, M., Cardador, M.J. (2016). Regulated disinfection byproducts in minimally processed vegetables and beverages. En Kotzekidou, P. (Eds). *Food Hygiene and*

- Toxicology in Ready-To-Eat Foods*. pp. 417-438. Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00023-6>.
- Garrido, Y. (2016). *Estrategias de intervención en precosecha y postcosecha para mejorar la calidad y prolongar la vida útil de 'hojas jóvenes' en IV gama*. (Tesis doctoral). Facultad de Biología, Universidad de Murcia.
<https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/50762>.
- Garrido, Y., Marín, A., Tudela, J.A., Allende, A., Gil, M.I. (2019). Chlorate uptake during washing is influenced by product type and cut piece size, as well as washing time and wash water content. *Postharvest Biology and Technology*, 151, 45-52.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.01.014>.
- Garrido, Y., Marín, A., Tudela, J.A., Truchado, P., Allende, A., Gil, M.I. (2020). Chlorate accumulation in commercial lettuce cultivated in open field and irrigated with reclaimed water. *Food Control*, 114, 107283.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107283>.
- Gayán, E., Condón, S., Álvarez, I. (2014). Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (1), 1-20.
<https://doi.org/10.1007/s11947-013-1168-7>.
- Gil, M.I. (2021). *Control de higienizantes en el agua de proceso*. Biblioteca Horticultura.
https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/control_de_higienizantes_en_el_agua_de_proceso.
- Gil M.I. Allende, A., Beltrán, D., Selma, V. (2005). Nuevas tendencias de procesado y conservación de alimentos vegetales de IV gama. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación [CTC] Alimentación* 26, 146-151.
<http://hdl.handle.net/10261/5778>.

- Gil, M.I., Marín, A., Andujar, S., Allende, A. (2016). Should chlorate residues be of concern in fresh-cut salads? *Food Control*, 60, 416-421.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.023>.
- Gil, M.I., Selma, M.V. (2006). Overview of hazards in fresh-cut produce production: control and management of food safety hazards. En J. James (Ed.). *Microbial Hazard Identification in Fresh Fruit and Vegetables*. (Cap. 6).
<https://doi.org/10.1002/0470007761.ch6>.
- Gil, M.I., Selma, M.V., Lopez-Galvez, F., Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 37-45.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.021>.
- Gil, M.I., Selma, M.V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele M., Allende, A. (2014). Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (4), 453-468.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657808>.
- Gilca, A.F., Teodosiu, C., Fiore, S., Musteret, C.P. (2020). Emerging disinfection byproducts: A review on their occurrence and control in drinking water treatment processes. *Chemosphere*, 259, 127476.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127476>.
- Giner-Santonja, G., Karlis, P., Stubdrup, K., Brinkmann, T. Roudier, S. (2019). Best Available Techniques (BAT) reference document for the food, drink and milk industries: Industrial Emissions Directive 2010/75/EU (Integrated Pollution Prevention and Control). EUR 29978 EN, Publications Office of the European

- Union, Luxembourg, 2019, ISBN 978-92-76-13091-8.
<https://doi.org/10.2760/243911>.
- Golfinopoulos, S.K., Nikolaou, A.D., Lekkas, T.D. (2003). The occurrence of disinfection byproducts in the drinking water of Athens, Greece. *Environmental Science and Pollution Research*, 10, 368-372.
<https://doi.org/10.1065/espr2002.06.124>.
- Gombas, D., Luo, Y., Brennan, J., Shergill, G., Petran, R., Walsh, R., Hau, H., Khurana, K., Zomorodi, B., Rosen, J., Varley, R., Deng, K. (2017). Guidelines to validate control of cross-contamination during washing of fresh-cut leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 80 (2), 312–330. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-258>.
- Gómez-López, V.M. (2012). Continuous UV-C light. En Gómez-López, V. M. (eds.) *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. pp. 215-221. Wiley & Sons, Inc.
- Gómez-López, V.M., Lannoo, A.-S., Gil, M.I., Allende, A. (2014). Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. *Food Control*, 42, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.034>.
- Gómez-López, V.M., Marín, A., Medina-Martínez, M.S., Gil, M.I., Allende, A. (2013). Generation of trihalomethanes with chlorine-based sanitizers and impact on microbial, nutritional and sensory quality of baby spinach. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.05.012>.
- Gómez-López, V.M., Rajkovic, A., Ragaert, P., Smigic, N., Devlieghere, F. (2009). Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. *Trends*

- in Food Science & Technology*, 20 (1), 17-26.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.005>.
- Gong, T., Zhang, X. (2015). Detection, identification and formation of new iodinated disinfection byproducts in chlorinated saline wastewater effluents. *Water Research*. 68, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.041>.
- González-Aguilar, G., Ayala-Zavala, F., Chaidez-Quiron, C., Heredia, B., Castro-del Campo, N. (2012). Peroxyacetic acid. En Gómez-López, V. M. (eds.) *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. pp. 215-221. Wiley & Sons, Inc.
- Gopal, K., Tripathy, S.S., Bersillon, J.L., Dubey, S.P. (2007). Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. *Journal of Hazardous Materials*, 140, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.063>.
- Graça, A., Salazar, M., Quintas, C., Nunes, C. (2013). Low dose UV-C illumination as an eco-innovative disinfection system on minimally processed apples. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.04.013>.
- Greenspan, F.P., MacKellar, D.G. (1948). Analysis of aliphatic per acids. *Analytical Chemistry*, 20, 1061-1063. <https://doi.org/10.1021/ac60023a020>.
- Guerreiro-Tanomaru, J.M., Morgental, R.D., Flumignan, D.L., Gasparini, F., Oliveira, J.E., Tanomaru-Filho, M. (2011). Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112 (1), 132-135.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.009>.

- Guo, K., Wu, Z., Shang, C., Yao, B., Hou, S., Yang, X., Song, W., Fang, J. (2017). Radical chemistry and structural relationships of PPCP degradation by UV/chlorine treatment in simulated drinking water. *Environmental Science & Technology*, 51, 10431-10439. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02059>.
- Hach, ¿Cuál es la diferencia entre el reactivo de DPD para cloro total o cloro libre? (2022). Acceso el 21 de abril de 2022 en https://essupport.hach.com/app/answers/answer_view/a_id/1024877/~/%C2%BFcu%C3%A1-es-la-diferencia-entre-el-reactivo-de-dpd-para-cloro-total-o-cloro-libre%3F.
- Hamingeroova, M., Borunsky, L., Beckmann, M. (2015). *Membrane technologies for water and wastewater treatment on the European and Indian market*. Techview Report of Fraunhofer Center for International Management and Knowledge Economy. https://www.gita.org.in/Attachments/Reports/TechView_Water_Filtration.pdf.
- Harp, D.L (2019). *Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater*. Technical Information Series — Booklet No.17. Hach Company. Acceso el 10 de mayo de 2022 en <https://stpnq.com/wp-content/uploads/2014/08/Chlorine-Analysis-EN.pdf>.
- Harris, R., Page, T. (1974). The implications of cancer-causing substances in the Mississippi river waters. Environmental Defence Fund.
- Hassaballah, A.H., Bhatt, T., Nyitrai, J., Dai, N., Sassoubre, L. (2020). Inactivation of: *E. coli*, *Enterococcus* spp., somatic coliphage, and *Cryptosporidium parvum* in wastewater by peracetic acid (PAA), sodium hypochlorite, and combined PAA-ultraviolet disinfection. *Environmental Science & Water Research Technology*, 6, 197-209. <https://doi.org/10.1039/c9ew00837c>.

-
- Hassaballah, A.H., Nyitrai, J., Hart, C.H., Dai, N., Sassoubre, L.M. (2019). A pilot-scale study of peracetic acid and ultraviolet light for wastewater disinfection. *Environmental Science & Water Research Technology*, 5, 1453-1463. <https://doi.org/10.1039/C9EW00341J>.
- Hilgren, J., Swanson, K.M.J., Diez-Gonzalez, F., Cords, B. (2007). Inactivation of *Bacillus anthracis* spores by liquid biocides in the presence of food residue. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6370-6377. <https://doi.org/10.1128/AEM.00974-07>.
- Hoekstra, A.Y., Chapagain, A.K., Aldaya M.M., Mekonnen, M.M. (2011). *The Water Footprint Assessment Manual Setting the Global Standard*. Eds. Earthscan. https://waterfootprint.org/media/downloads/TheWaterFootprintAssessmentManual_2.pdf.
- Holvoet, K., Jacxsens, L., Sampers, I., Uyttendaele, M. (2012). Insight in prevalence and distribution of microbial contamination to evaluate water management in fresh produce processing industry. *Journal of Food Protection*, 75, 671-681. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-175>.
- Hong, H., Xiong, Y., Ruan, M., Liao, F., Lin, H., Liang, Y. (2013). Factors affecting THMs, HAAs and HNMs formation of Jin Lan Reservoir water exposed to chlorine and monochloramine. *Science of the Total Environment*, 444, 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.086>.
- Hossain, I., Imteaz, M.A. and Khastagir, A. (2021). Water footprint: applying the water footprint assessment method to Australian agriculture. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 101, 4090-4098. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11044>.

- Houde, M., Khodaei N., Benkerroum N., Karboune S. (2018). Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 254, 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156>.
- Hrudey, S.E. (2009). Chlorination disinfection by-products, public health risk tradeoffs and me. *Water Research*, 43 (8), 2057-2092. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.011>.
- Hu, S., Gong, T., Wang, J., Xian, Q. (2019). Trihalomethane yields from twelve aromatic halogenated disinfection byproducts during chlor(am) ination. *Chemosphere* 228, 668-675. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.167>.
- Hua, G., Reckhow, D.A. (2006). Determination of TOCl, TOBr and TOI in drinking water by pyrolysis and off-line ion chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2), 495-504. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0214-3>.
- Hua, G., Reckhow, D.A., Kim, J. (2006). Effect of bromide and iodide ions on the formation and speciation of disinfection byproducts during chlorination. *Environmental Science Technology*, 40, 3050-3056. <https://doi.org/10.1021/es0519278>.
- Hua, L.C., Kim, E., McCurry, D.L., Huang, C., Mitch, W.A. (2020). Novel chlorination byproducts of tryptophan: initial high-yield transformation products versus small molecule disinfection byproducts. *Environmental Science & Technology Letters*, 7, 149-155. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00011>.
- Hua, Z., Guo, K., Kong, X., Lin, S., Wu, Z., Wang, L., Huang, H., Fang, J. (2019). PPCP degradation and DBP formation in the solar/free chlorine system: effects of pH and dissolved oxygen. *Water Research*, 150, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.041>.

- Hua, Z., Li, D., Wu, Z., Wang, D., Cui, Y., Huang, X., Fang, J. (2021). DBP formation and toxicity alteration during UV/chlorine treatment of wastewater and the effects of ammonia and bromide. *Water Research*, 188, 116549. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116549>.
- Huang, B., Rohrer, J. (2020). Targeted quantitation mode comparison of haloacetic acids, bromate, and dalapon in drinking water using ion chromatography coupled to high-resolution (orbitrap) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1630, 461538. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461538>.
- Huang, Y., Shi, R., Gee, W., Bonderud, R. (2012). Matrix effect and recovery terminology issues in regulated drug bioanalysis. *Bioanalysis*, 4. <https://doi.org/10.4155/bio.11.315>.
- Hunt, A.L., Alder, J.F. (1996). Quantitative analysis of chlorine in air by gas chromatography. *Analytical Communications*, 33, 61-64. <https://doi.org/10.1039/AC9963300061>.
- Ignat, A., Manzocco, L., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., Nicoli, M.C. (2014). Minimization of water consumption in fresh-cut salad washing by UV-C light. *Food Control*, 50, 491-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.036>.
- INE. (2013). Instituto Nacional de Estadística. *Uso del agua en la industria Manufacturera (2007-2010)*. Acceso el 29 de marzo de 2022 en https://www.ine.es/daco/daco42/ambiente/aguaindu/uso_agua_indu0710.pdf.
- INE. (2021). Instituto Nacional de Estadística. *Objetivo 6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos*. Acceso el 29 de marzo de 2022 en <https://www.ine.es/dyngs/ODS/es/indicador.htm?id=5013>.
- INSST. (1994). Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. *Nota Técnica de Prevención (NTP) 341: Exposición a cloro en piscinas cubiertas*.

- https://www.insst.es/documents/94886/326827/ntp_341.pdf/7af0d487-75d8-4fd4-a4e9-19147328a6f5.
- ICY. (2022). Instrumentación Científica Yáñez. *Analizador de halógenos orgánicos adsorbibles AOX-200*. Acceso el 1 de abril de 2022 en [http://www.icy.cl/pdfs/\(32\)AOX-200-ESP.pdf](http://www.icy.cl/pdfs/(32)AOX-200-ESP.pdf).
- ILSI. (2008). International Life Science Institute. Considering Water Quality for Use in the Food Industry. https://ils.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/R2008Con_H2O.pdf.
- Intriago, J.C., López-Gálvez, F., Allende, A., Vivaldi, G.A., Camposeo, S., Nicolás, E., Alarcón, J.J., Pedrero, F. (2018). Agricultural reuse of municipal wastewater through an integral water reclamation management. *Journal of Environmental Management*, 213, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.011>.
- ISO. (2020). Organización Internacional de Normalización. Guidelines for treated wastewater use for irrigation projects — Part 2: Development of the project. (ISO 16075-2:2020). <https://www.iso.org/standard/73483.html>.
- Isosaari, P., Hermanowicz, S.W., Rubin, Y. (2010). Sustainable natural systems for treatment and disposal of food processing wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 40, 662-697. <https://doi.org/10.1080/10643380802359396>.
- Jiang, J., Han, J., Zhang, X. (2020). Nonhalogenated aromatic DBPs in drinking water chlorination: a gap between NOM and halogenated aromatic DBPs. *Environmental Science & Technology*, 54 (3), 1646-1656. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06403>.

- Johnson, M., Melbourne, P. (1996). Photolytic spectroscopic quantification of residual chlorine in potable waters, *Analyst*, *121*, 1075-1078. <https://doi.org/10.1039/AN9962101075>.
- Kagliwal, L.D., Patil, S.C., Pol, A.S., Singhal, R.S., Patravale, V.B. (2011). Separation of bioactives from seabuckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction methodology through solubility parameter approach. *Separation and Purification Technology*, *80*, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.008>.
- Kali, S., Khan, M., Ghaffar, M.S., Rasheed, S., Waseem, A., Iqbal, M., Niazi, M., Zafar, M.I. (2021). Occurrence, influencing factors, toxicity, regulations, and abatement approaches for disinfection by-products in chlorinated drinking water: A comprehensive review. *Environmental Pollution*, *281*, 116950. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116950>.
- Kataki, S., Chatterjee, S., Vairale, M.G., Sharma, S., Dwivedi, S.K. (2021). Concerns and strategies for wastewater treatment during COVID-19 pandemic to stop plausible transmission. *Resources, Conservation Recycling*, *164*, 105156. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105156>.
- Kim, Y.H., Jeong, S.G., Back, K.H., Park, K.H., Chung, M.S., Kang, D.H. (2013). Effect of various conditions on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in fresh-cut lettuce using ultraviolet radiation. *International Journal of Food Microbiology*, *166*, 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.010>.
- Kirk, O., Damhus, T., Christensen, M.V. (1992). Determination of peroxycarboxylic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, *606*, 49-53. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85256-S](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85256-S).

- Kishimoto, N. (2019). State of the art of UV/chlorine advanced oxidation processes: their mechanism, byproducts formation, process variation, and applications. *Journal of Water and Environment Technology*, 17 (5), 302-335. <https://doi.org/10.2965/jwet.19-021>.
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30, 47-55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8).
- Klemes, J., Smith, R., Kim, J.K. (2008). *Handbook of Water and Energy Management in Food Processing*. Woodhead Publishing-Elsevier.
- Koivunen, J., Heinonen-Tanski, H. (2005). Inactivation of enteric micro-organisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Research*, 39, 1519-1526. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.021>.
- Kontos, S.S., Katrivesis, F.K., Constantinou, T.C., Zoga, CA., Ioannou, I.S., Koutsoukos, P.G., Paraskeva, C.A. (2018). Implementation of membrane filtration and melt crystallization for the effective treatment and valorization of olive mill wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 193, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.11.005>.
- Korotta-Gamage, S.M., Sathasivan, A. (2017). A review: potential and challenges of biologically activated carbon to remove natural organic matter in drinking water purification process. *Chemosphere* 167, 120-138. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.097>.
- Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Scrimanti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D. (2006). Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environmental Science & Technology*, 40, 7175-7185. <https://doi.org/10.1021/es060353j>.

- Kumar, M., Mazur, S., Ork, B.L., Postnikova, E., Hensley, L.E., Jahrling, P.B., Johnson, R., Holbrook, M.R. (2015). Inactivation and safety testing of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 223, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.002>.
- Kundu, B., Richardson, S.D., Swartz, P.D., Matthews, P.P., Richard, A.M., DeMarini, D.M. (2004). Mutagenicity in *Salmonella* of halonitromethanes: a recently recognized class of disinfection by-products in drinking water. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 562 (1-2), 39-65. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.05.007>.
- Kurup, G.G., Adhikari, B., Zisu, B. (2019). Recovery of proteins and lipids from dairy wastewater using food grade sodium lignosulphonate. *Water Resources and Industry*, 22, 100114. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2019.100114>.
- Lam A.C., Can Karaca A., Tyler R.T., Nickerson M.T. (2018). Pea protein isolates: Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34, 126-147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>.
- Larson, R.A., Rockwell, A.L. (1979). Chloroform and chlorophenol production by decarboxylation of natural acids during aqueous chlorination. *Environmental Science and Technology*, 13, 325-329. <https://doi.org/10.1021/es60151a014>.
- Lazarova, V., Savoye, P., Janex, M.L., Blatchley, E.R., Pommeypuy, M. (1999). Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. *Water Science & Technology*, 40, 203-213. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00502-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00502-8).
- Lee, W.N., Huang, C.H. (2019). Formation of disinfection byproducts in wash water and lettuce by washing with sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers. *Food Chemistry: X*, 1, 100003. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2018.100003>.

- Lee, W.N., Huang, C.H., Zhu, G. (2018). Analysis of 40 conventional and emerging disinfection by-products in fresh-cut produce wash water by modified EPA methods. *Food chemistry*, 256, 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.134>.
- Lee, W.N., Huang, C.H., Zhu, G. (2019). Analytical methods for conventional and emerging disinfection by-products in fresh-cut produce. *Food Chemistry*, 291, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.150>.
- Lefevre, F., Audic, J.M., Ferrand, F. (1992). Peracetic acid disinfection of secondary effluents discharged off coastal seawater. *Water Science & Technology*, 25, 155-64. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0347>.
- Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E., Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 16, 2548-2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>.
- Lehto, M. (2019). *Improving quality and treatment of water and vegetables in fresh-cut vegetable processing* (Tesis doctoral). Natural Resources Institute Finland, Helsinki.
- Lehto, M., Sipilä, I., Alakukku, L., Kymäläinen, H.-R. (2014). Water consumption and wastewaters in fresh-cut vegetable production. *Agricultural and Food Science*, 23, 246-256. <https://doi.org/10.23986/afsci.41306>.
- Len, S., Hung, Y., Erickson, M., Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal of Food Protection*, 63, 1534-1537. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.11.1534>.

- Li, C., Wang, D., Xu, X., Wang, Z. (2017a). Formation of known and unknown disinfection by-products from natural organic matter fractions during chlorination, chloramination, and ozonation. *Science of the Total Environment*, 587 (588), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.108>.
- Li, J., Jiang, J., Pang, S.Y., Cao, Y., Zhou, Y., Guan, C. (2020). Oxidation of iodide and hypoiodous acid by non-chlorinated water treatment oxidants and formation of iodinated organic compounds: a review. *Chemical Engineering Journal*, 386, 123822. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2019.123822>.
- Li, X.F., Mitch, W.A. (2018). Drinking water disinfection byproducts (DBPs) and human health effects: multidisciplinary challenges and opportunities. *Environmental Science & Technology*, 52, 1681-1689, <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05440>.
- Li, Y., George, E.J. (2005). Analysis of perchlorate in water by reversed-phase LC/ESI-MS/MS using an internal standard technique. *Analytical Chemistry*, 77 (14), 4453-4458. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0500986>.
- Li, Y., Yang, M., Zhang, X., Jiang, J., Liu, J., Fu Yau, C., Graham, N.J.D., Li, X. (2017b). Two-step chlorination: a new approach to disinfection of a primary sewage effluent, *Water Research*, 108, 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.019>.
- Li, Y., Zhang, X., Yang, M., Liu, J., Li, X., Graham, N.J.D., Yang, B. (2017c). Three-step effluent chlorination increases disinfection efficiency and reduces DBP formation and toxicity, *Chemosphere* 168, 1302-1308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.137>.
- Li, Z., Liu, X., Huang, Z., Hu, S., Wang, J., Qian, Z., Feng, J., Xian, Q., Gong, T. (2019). Occurrence and ecological risk assessment of disinfection byproducts from

- chlorination of wastewater effluents in East China. *Water Research*, 157, 247-257.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.072>.
- Li, Z., Song, G., Bi, Y., Gao, W., He, A., Lu, Y., Wang, Y., Jiang, G. (2021). Occurrence and distribution of disinfection byproducts in domestic wastewater effluent, tap water, and surface water during the SARS-CoV-2 pandemic in China. *Environmental Science & Technology*, 55, 4103-4114.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06856>.
- Liang, L., Singer, P. C. (2003). Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. *Environmental Science and Technology*, 37, 2920-2928. <https://doi.org/10.1021/es026230q>.
- Lie-Piang, A., Braconi, N., Boom, R.M., van der Padt, A. (2021). Less refined ingredients have lower environmental impact – A life cycle assessment of protein-rich ingredients from oil- and starch-bearing crops. *Journal of Cleaner Production*, 292, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126046>.
- Liu, J., Zhang, X., Li, Y., Li, W., Hang, C., Sharma, V.K. (2019). Phototransformation of halophenolic disinfection byproducts in receiving seawater: kinetics, products and toxicity. *Water Research*, 150, 68-76.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.059>.
- Liu, W., Wu, Z.L., Wang, Y.J., Li, R., Yin, N.N., Jiang, J.X. (2015). Separation of isoflavone aglycones using chitosan microspheres from soy whey wastewater after foam fractionation and acidic hydrolysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 25, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.10.024>.
- Liu, X., Chen, L., Yang, M., Tan, C., Chu, W. (2020). The occurrence, characteristics, transformation and control of aromatic disinfection by-products: A Review. *Water Research*, 116076. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116076>.

- Loos, R., Barceló D. (2001). Determination of haloacetic acids in aqueous environments by solid-phase extraction followed by ion- pair liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 938, 45-55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01092-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01092-5).
- López-Gálvez, F. (2009). *Estrategias de lavado para mantener la calidad y garantizar la seguridad microbiológica de vegetales en IV gama*. (Tesis doctoral). Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Universidad Miguel Hernández de Elche. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=147203>.
- López-Gálvez, F., Andújar, S., Marín, A., Tudela, J.A., Allende, A., Gil, M.I. (2018). Disinfection by-products in baby lettuce irrigated with electrolysed water. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 2981-2988. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8796>.
- López-Gálvez, F., Gil, M.I., Truchado, P., Selma, M. V. Allende, A. (2010). Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide and sodium hypochlorite. *Food Microbiology*, 27, 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.009>.
- López-Gálvez, F., Sampers, I., Gil, M.I., Allende, A. (2017). Modelling of *E. coli* inactivation by chlorine dioxide in irrigation water. *Agricultural water management*, 192, 98-102. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.07.001>.
- López-Gálvez, F., Truchado, P., Tudela, J.A., Gil, M.I., Allende, A. (2020). Critical points affecting the microbiological safety of bell peppers washed with peroxyacetic acid in a commercial packinghouse. *Food Microbiology*, 88, 103409. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103409>.

- López-Gálvez, F., Tudela, J.A., Allende, A., Gil, M.I. (2019). Microbial and chemical characterization of commercial washing lines of fresh produce highlights the need for process water control. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 211-219. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.002>.
- Luongo, G., Previtera, L., Ladhari, A., Di Fabio, G., Zarrelli, A. (2020). Peracetic acid vs. sodium hypochlorite: degradation and transformation of drugs in wastewater, *Molecules* 25 (10), 2294. <https://doi.org/10.3390/molecules25102294>.
- Luo, Q., Wang, D., Wei, Z., Wang, Z. (2013). Optimized chromatographic conditions for separation of halogenated acetic acids by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1277, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.046>.
- Luo, Y. (2007). Fresh-cut produce wash water reuse affects water quality and packaged product quality and microbial growth in Romaine Lettuce. *Horticultural Science* 42 (6), 1413–1419. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.6.1413>.
- Luo, Y., Feng, L., Liu, Y., Zhang, Y. (2020). Disinfection by-products formation and acute toxicity variation of hospital wastewater under different disinfection processes. *Separation and Purification Technology*, 238, 116405. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.116405>.
- Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H., Abadias, M., Conway, W. (2011). Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 crosscontamination during fresh-cut produce wash. *Journal of Food Protection*, 74, 352-358. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-429>.

- Luukkonen, T., Pehkonen, S.O. (2017). Peracids in water treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47, 1-39. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1272343>.
- Malik, S.N., Ghosh, P.C., Vaidya, A.N., Mudliar, S.N. (2020). Hybrid ozonation process for industrial wastewater treatment: Principles and applications: A review. *Journal of Water Process Engineering*, 35, 101193. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101193>.
- Manzardo, A., Ren, J., Piantella, A., Mazzi, A., Fedele, A., Scipioni, A. (2014). Integration of water footprint accounting and costs for optimal chemical pulp supply mix in paper industry. *Journal of Cleaner Production*, 72, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.014>.
- Manzocco, L., Ignat, A., Anese, M., Bot, F., Calligaris, S., Valoppi, F., Nicoli, M.C. (2015). Efficient management of the water resource in the fresh-cut industry: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 46 (2), 286-294. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.09.003>.
- Mao, M. (2016). *Critical review of disinfection by-products (DBPs) in fresh produce and process water*. (Tesis doctoral). Georgia Institute of Technology. The university of Georgia.
- Marx, J. (1974). Drinking water: Another source of carcinogens? *Science* 186 (4166), 809-811. <https://doi.org/10.1126/science.186.4166.809>.
- Mathew, J., McMillin, R., Gandhi, J., Mohsin, S., Czyborra, S. (2009). Trace level haloacetic acids in drinking water by direct injection ion chromatography and single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography Science*, 47, 505-509. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.7.505>.

- Mazhar, M.A., Khan, N.A., Ahmed, S., Khan, A.H., Hussain, A., Rahisuddin, Changani, F., Yousefi, M., Ahmadi, S., Vambol, V. (2020). Chlorination disinfection by-products in municipal drinking water – A review. *Journal of Cleaner Production*, 273, 123159. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123159>.
- McCarthy W.P., O'Callaghan T.F., Danahar M., Gleeson D., O'Connor C., Fenelon M.A., Tobin J.T. (2018). Chlorate and other oxychlorine contaminants within the dairy supply chain. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17 (6), 1561-1575. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12393>.
- McDonnell, G., Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147-179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>.
- Mdsocialesa2030. (2021). Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030. *ODS 6: Agua limpia y saneamiento*. Acceso el 28 de marzo de 2022 en <https://www.mdsocialesa2030.gob.es/agenda2030/index.htm>.
- Meneses, Y.E., Stratton, J., Flores, R.A. (2017). Water reconditioning and reuse in the food processing industry: Current situation and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.008>.
- Meng, L., Wu, S., Ma, F, Jia, A., Hu, J. (2010). Trace determination of nine haloacetic acids in drinking water by liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4873-4876. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.074>.
- MerckMillipore. (2021a). *Spectroquant, Test en cubetas COT*. Acceso el 7 de julio de 2022 en https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/TOC-Cell-Test,MDA_CHEM-114878#anchor_PI.

- MerckMillipore. (2021b). *Reflectoquant, Test ácido peracético*. Acceso el 7 de julio de 2022 en https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Peracetic-Acid-Test,MDA_CHEM-116975#documentation.
- Miklos, D.B., Remy, C., Jekel, M., Linden, K.G., Drewes, J.E., Hübner, U. (2018). Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment – A critical review. *Water Research*, 139, 118-131. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.042>.
- Millan-Sango, D., Allende, A., Spiteri, D. (2017). Treatment of fresh produce water effluents by non-thermal technologies. *Journal of Food Engineering*, 199, 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.006>.
- Millar, K.A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., Barry-Ryan, C. (2019). Proximate composition and antinutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103233. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103233>.
- Milly, P.C., Betancourt, J., Falkenmark, M., Hirsch, R.M., Kundzewicz, Z.W., Lettenmaier, D.P., Stouffer, R.J. (2008). Climate change—stationarity is dead: whither water management? *Science*, 319, 573–574. <https://doi.org/10.1126/science.1151915>.
- MMA. (2006). Ministerio de Medio Ambiente. *Guía de las mejores técnicas disponibles (MTD) en España en el sector de los transformados vegetales*. <https://prtr-es.es/Data/images//Gu%C3%ADa%20MTD%20en%20Espa%C3%B1a%20Transformados%20Vegetales-1F078444C914B509.pdf>.
- Mishra, B.K., Gupta, S.K., Sinha, A. (2014). Human health risk analysis from disinfection byproducts (DBPs) in drinking and bathing water of some Indian cities. *Journal*

- of Environmental Health Science & Engineering*, 12 (73), 1-10.
<https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-73>.
- Mishra, V., Abrol, G.S., Dubey, N. (2018). Sodium and calcium hypochlorite as postharvest disinfectants for fruits and vegetables. En Mohammed, M.W (Ed.). *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. pp. 253-272. Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00014-5>.
- Mompremier, R., Fuentes Mariles, O.A., Becerril Bravo, J.E., Ghebremichael, K. (2019). Study of the variation of haloacetic acids in a simulated water distribution network. *Water Supply*, 19 (1), 88-96. <https://doi.org/10.2166/ws.2018.055>.
- Mondor, M., Ippersiel, D., Lamarche, F. (2012). Electrodialysis in food processing. En Boye, J.I., Arcand, Y. (Eds.). *Green Technologies in Food Production and Processing*. pp. 295-326. Boston, MA: Springer.
- Montgomery, D., Peck, E.A., Vining, G.G. (2006). *Introduction to Linear Regression Analysis*. 4^a Ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Morawicki, R.O. (2011). *Handbook of sustainability for the food sciences*. John Wiley & Sons.
- Morris, J.C. (1966). The acid ionization constant of HClO from 5°C to 35°C. *The Journal of Physical Chemistry*, 70, 3798-3805. <https://doi.org/10.1021/j100884a007>.
- Moura-Bernardes, A. (2014). General aspects of membrane separation processes. En Moura Bernardes, A., Siqueira Rodrigues, M., Zoppas Ferreira, J. (Eds). *Electrodialysis and Water Reuse*. pp. 3-9. Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40249-4_2.

- Munther, D., Wu, J. (2013). Enhanced surveillance on food-borne disease outbreaks: Dynamics of cross-contamination in biocidal wash procedure. *Journal of Theoretical Biology*, 321, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.12.024>.
- Muñoz-Lucas, S., Sánchez-García, R. (2018). El agua en la industria alimentaria. *Boletín de la Sociedad Española de Hidrología Médica*, 33 (2), 157-171. <https://doi.org/10.23853/bsehm.2018.0571>.
- Nahim-Granados, S., Rivas-Ibáñez, G., Sánchez-Pérez, J.A., Oller, I., Malato, S., Polo-López, M.I. (2020). Fresh-cut wastewater reclamation: Techno-Economical assessment of solar driven processes at pilot plant scale. *Applied Catalysis B: Environmental*, 278, 119334. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.119334>.
- Narender, Mukesh, S., Rani, V., Kumark A., Verma, K. Karwasra, N. (2018). Performance evaluation of vegetable washer for carrot crop. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7 (1), 454-458. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.053>.
- NCI. (1976). National Cancer Institute. *Report on the Carcinogenesis Bioassay of Chloroform* (CAS No. 67-66-3). Carcinogenesis technical report series, 1-60. PMID: 25299382.
- Nguyen-the, C., Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 371-401. <https://doi.org/10.1080/10408399409527668>.
- Nieuwenhuijsen M.J., Toledano M.B., Eaton N.E., Fawell, J.F., Elliott, P. (2000). Chlorination disinfection byproducts in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *Occupational and Environmental Medicine*, 57, 73-85. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.57.2.73>.

- Nikmaram, N., Rosentrater, K.A. (2019). Overview of some recent advances in improving water and energy efficiencies in food processing factories. *Frontiers in Nutrition*, 6, 20. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00020>.
- Nikolaou, A.D., Golfopoulos, S.K., Lekkas, T.D., Arhonditsis, G.B. (2004). Factors affecting the formation of organic by-products during water chlorination: a bench-scale study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 159, 357-371. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000049189.61762.61>.
- Nougadère, A., Sirot, V., Cravedi, J.-P., Vasseur, P., Feidt, C., Fussell, R. J., Hu, R., Leblanc, J.-C., Jean, J., Rivière, G. (2020). Dietary exposure to pesticide residues and associated health risks in infants and young children—results of the French infant total diet study. *Environment International*, 137, 105529. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105529>.
- Ochando-Pulido, J.M., Martínez-Férez, A. (2018). Novel micro/ultra/nanocentrifugation membrane process assessment for revalorisation and reclamation of agricultural wastewater. *Journal of Environmental Management*, 222, 447-453. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.092>.
- Oh, S.-W., Gray, P.M., Dougherty, R.H., Kang-H, D. (2005). Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 56-60. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01711.x>.
- Oki, T., Quioco, R.E. (2020). Economically challenged and water scarce: identification of global populations most vulnerable to water crises. *International Journal of Water Resources Development*, 36, 416-428. <https://doi.org/10.1080/07900627.2019.1698413>.

- Ölmez, H. (2013). Water consumption, reuse and reduction strategies in food processing. En Tiwari, B.K, Norton, T., Holden, N.M. (Eds.). *Sustainable Food Processing* (Cap.17). 1ª Ed. John Wiley & Sons.
- Ölmez, H. (2017). Environmental impacts of minimally processed refrigerated fruits and vegetables' industry. En Yildiz, F., Wiley, R. (Eds.). *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables*. Food Engineering Series (Cap. 22). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6_22.
- Ölmez, H., Kretschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (3), 686-693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>.
- OmegaPeru. (2020). *Método de Determinación de Cloro Libre y Total por titulación Amperométrica con el Titulador Automático AT1000 de Hach*. Acceso el 13 de abril de 2022 en <https://omegaperu.com.pe/conoces-el-metodo-de-determinacion-de-cloro-libre-y-total-por-titulacion-amperometrica-con-el-titulador-automatico-at1000-de-hach/>
- ONU. (2022). Organización de las Naciones Unidas. *Paz, dignidad e igualdad en un planeta sano*. Acceso el 28 de marzo de 2022 de <https://www.un.org/es/global-issues/population>.
- OMS. (2000). Organización Mundial de la Salud. *Environmental health criteria 216, disinfectants and disinfectant by-products*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42274>.
- OMS. (2017). Organización Mundial de la Salud. *Guidelines for drinking-water quality: 4th ed incorporating the first addendum*. Geneva. ISBN 978-92-4-154995-0. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>.

- Palintest. (2022a). *Manual de usuario PAASense*. Acceso el 7 de abril de 2022 en https://www.palintest.com/wp-content/uploads/2019/04/PAASense_User-Manual_Web.pdf.
- Palintest. (2022b). *Manual de usuario ChloroSense HR*. Acceso el 12 de abril de 2022 en https://www.palintest.com/wp-content/uploads/2019/04/ChloroSense-HR_User-Manual_Web.pdf.
- Pao, S., Long III, W., Kim, C. Kelsey, D.F. (2012). Produce washers. En Gómez-López, V. M. (eds.) *Decontamination of Fresh and Minimally Processed Produce*. pp. 89-101. Wiley & Sons, Inc.
- Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J.J., Koukoulakis, P., Asano, T. (2010). Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece. *Agricultural Water Management*, 97 (9), 1233-1241. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.03.003>.
- Pérez-Antón, A. (2016). Desarrollo de combinaciones de técnicas de tratamiento de muestra y procesado de datos para la simplificación de métodos analíticos. (Tesis doctoral). Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Universidad de Salamanca. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=155470>.
- Perveen, S., Hashmi, I., Khan, R. (2019). Evaluation of genotoxicity and haematological effects in common carp (*Cyprinus carpio*) induced by disinfection by-products. *Journal of Water & Health* 17 (5), 762-776. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.261>.
- Pinkernell, U., Effkemann, S., Karst, U. (1997). Simultaneous HPLC determination of peroxyacetic acid and hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, 69, 3623-3627. <https://doi.org/10.1021/ac9701750>.

- Pinkernell, U., Effkemann, S., Nitzsche, F., Karst, U. (1996). Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of peroxyacetic acid. *Journal of Chromatography A*, 730, 203-208. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01346-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01346-6).
- Pisarenko, A.N., Stanford, B.D., Quiñones, O.; Pacey, G.E., Snyder, S.A. (2010). Rapid analysis of perchlorate, chlorate and bromate ions in concentrated sodium hypochlorite solutions. *Analytica Chimica Acta*, 659 (1-2), 216-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.061>.
- Planas, C., Palacios, Ó., Ventura, F., Boleda, M.R., Martín, J., Caixach, J. (2019). Simultaneous analysis of 11 haloacetic acids by direct injection-liquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry: occurrence and evolution in chlorine-treated water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 3905-3917. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01864-5>.
- Plewa, M.J., Kargalioglu, Y., Vankerk, D., Minear, R.A. Wagner, E.D. (2002). Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 40, 134-142. <https://doi.org/10.1002/em.10092>.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Jazwierska, P., Richardson, S.D., Chen, P.H., McKague, A.B. (2004). halonitromethane drinking water disinfection byproducts: chemical characterization and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 38 (1), 62-68. <https://doi.org/10.1021/es0304771>.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Mitch, W.A. (2011). Comparative mammalian cell cytotoxicity of water concentrates from disinfected recreational pools.

- Environmental Science & Technology*, 45 (9), 4159-4165.
<https://doi.org/10.1021/es104284h>
- Pojić, M., Mišan, A., Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93-104.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010>.
- Postigo, C., Emiliano, P., Valero, F. (2020). High-throughput and reliable determination of 13 haloacetic acids and dalapon in water and evaluation of control strategies. *Environmental Sciences: Water Research & Technology*, 6, 2499.
<https://doi.org/10.1039/D0EW00296H>.
- Pourmoghaddas, H., Stevens, A.A., Kinman, R.N., Dressman, R.C., Moore, L.A, Ireland, J.C (1993). Effect of bromide ion on formation of HAAs during chlorination. *Journal American Water Works Association*. 85, 82-87,
<https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1993.tb05924.x>.
- Prieto-Blanco, M.C., Alpendurada, M.F., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Machado, S., Gonçalves C. (2012). Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 94, 90-98.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.061>.
- Prominent. (2022). *DULCOTEST sensores para cloro libre*. Acceso el 13 de abril de 2022 en <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Prominent-sensors-free-chlorine-es-L.pdf>.

- Puchlik, M., Ignatowicz, K. (2017). Seasonal changes in quality of wastewater from fruit and vegetable industry. *EDP Science*, 22, 00139. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20172200139>.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.01.001>.
- Rajala-Mustonen, R.L., Toivola, P.S., Heinonen-Tanski, H. (1997). Effect of peracetic acid and UV irradiation on the inactivation of coliphages in wastewater. *Water Science & Technology*, 35, 237-41. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00265-5).
- Ramos-Ascue, J.D. (2018). Medición en línea de la DQO mediante correlación del coeficiente de absorción espectral de luz uv. *Producción + limpia*, 2 (13), 67-76. <https://doi.org/10.22507/pml.v13n2a8>.
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, 181, 115942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.
- Ranken, M. D., Kill, R.C., Baker, C. (2012). *Food industries manual*. Springer, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1129-4>.
- Raposo, F. (2016). Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 77, 167-185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.006>.
- Raposo, F., Barceló, D. (2021). Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus

- regulatory viewpoints. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 134, 116068.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116068>.
- Raposo, F., Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 129, 0165-9936.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>.
- Rattanakul, S., Oguma, K. (2017). Analysis of hydroxyl radicals and inactivation mechanisms of bacteriophage MS2 in response to a simultaneous application of UV and chlorine. *Environmental Science & Technology*, 51 (1), 455-462.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03394.s001>.
- Rattanakul, S., Oguma, K., Sakai, H., Takizawa, S. (2014). Inactivation of viruses by combination processes of UV and chlorine. *Journal of Water and Environment Technology*, 12 (6), 511-523. <https://doi.org/10.2965/jwet.2014.511>.
- Reckhow, D. A., Linden, K. G., Kim, J., Shemer, H., Makdissy, G. (2010). Effect of UV treatment on DBP formation. *Journal - American Water Works Association*, 102 (6), 100-114. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2010.tb10134.x>.
- Richardson, S.D. (2018). New disinfection by-product issues: emerging DBPs and alternative routes of exposure. *Global NEST Journal*, 7, 43-60.
<https://doi.org/10.30955/gnj.000320>.
- Richardson, S.D., Kimura, S.Y. (2020). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 92, 473-505.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05269>.
- Richardson, S.D., Plewa, M.J. (2020). To regulate or not to regulate? What to do with more toxic disinfection byproducts? *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 103939. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103939>.

- 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*, 636, 178-242. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>.
- Richardson, S.D., Postigo, C. (2015). Formation of DBPs: state of the science. En Karanfil, T., Mitch, B., Westerhoff, P., Xie, Y (Eds.). *Recent Advances in Disinfection By-products*. pp. 189-241. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1190.ch011>.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A. (2011). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 83, 4614-4648. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A. (2018). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 90, 398-428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (7), 373-386. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.011>.
- Rizzo, L., Agovino, T., Nahim-Granados, S., Castro-Alfárez, M., Fernández-Ibáñez, P., Polo-López, M.I. (2019). Tertiary treatment of urban wastewater by solar and UV-C driven advanced oxidation with peracetic acid: effect on contaminants of emerging concern and antibiotic resistance. *Water Research*, 149, 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.031>.
- Rizzo, L., Fiorentino, A., Anselmo, A. (2013). Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant E. coli strains. *Chemosphere*, 92, 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.021>.

- Rokhina, E.V., Makarova, K., Golovina, E.A., Van-As, H., Virkutyte, J. (2010). Free radical reaction pathway, thermochemistry of peracetic acid homolysis, and its application for phenol degradation: spectroscopic study and quantum chemistry calculations. *Environmental Science & Technology*, 44 (17), 6815-6821. <https://doi.org/10.1021/es1009136>.
- Rook, J.J. (1974). Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment and Examination* 23, 234-243.
- Rook, J.J. (1975). Uproar about chlorine. *Environmental Science & Technology*, 9 (1), 92-93. <https://doi.org/10.1021/es60100a604>.
- Roos, Y.H., Fryer, P.J., Knorr, D., Schuchmann, H.P., Schroën, K., Schutyser, M.A.I., Trystram, G., Windhab, E.J. (2016). Food engineering at multiple scales: case studies, challenges and the future—A European perspective. *Food Engineering Reviews*, 8, 91-115. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9125-z>.
- Rost, S., Gerten, D., Bondeau, A., Lucht, W., Rohwer, J., Schaphoff., S. (2008). Agricultural green and blue water consumption and its influence on the global water system. *Water Resources Reseach*, 44, W09405. <https://doi.org/10.1029/2007WR006331>.
- Rott, E., Kuch, B., Lange, C., Richter, P., Kugele, A., Minke, R. (2018). Removal of emerging contaminants and estrogenic activity from wastewater treatment plant effluent with UV/Chlorine and UV/H₂O₂ advanced oxidation treatment at pilot scale. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (5), 935. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050935>.
- Rubirola, A., Boleda, M.R., Galceran, M.T., Moyano, E. (2019). Formation of new disinfection by-products of priority substances (Directive 2013/39/UE and Watch

- List) in drinking water treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 28270-28283. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06018-9>.
- Ruiz-Zapata, R. (2001). *Bases de ingeniería ambiental con aplicaciones al tratamiento de aguas y residuos sólidos*. Eds. Universidad Miguel Hernández.
- Sadiq, R., Rodriguez, M.J. (2004). Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review. *Science of the Total Environment*, 321, 21-46. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.05.001>.
- Salazar-Benítez, J., Méndez-Rodríguez, C., Figueroa-Casas, A. (2021). Disinfection byproducts (DBPs) in drinking water supply systems: A systematic review, *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 123, 102987. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2021.102987>.
- Sánchez, J.M. (2020). Linear calibrations in chromatography: The incorrect use of ordinary least squares for determinations at low levels, and the need to redefine the limit of quantification with this regression model. *Journal of Separation Science*, 43, 2708-2717. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000094>.
- Sánchez, D., Laca, A., Simón, P., Abellán, M., Gil M.I., García, F., Solano, Y.L., Rancaño, A. (2020). Ácido peracético como alternativa para una efectiva desinfección de aguas residuales en EDAR. *Tecnoaqua*, 47, 36-42. <https://www.tecnoaqua.es/articulos/20201203/articulo-tecnico-acido-peracetico-alternativa-desinfeccion-aguas-residuales-acciona#.YwPHZ3ZBwUE>.
- Sánchez-Ruiz C., Martínez-Royano S., Tejero-Monzón, I. (1995). An evaluation of the efficiency and impact of raw wastewater disinfection with peracetic acid prior to ocean discharge. *Water Science & Technology*, 32, 159-66. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00060-1](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00060-1).

- SANTE. (2019). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed SANTE/12682/2019. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf.
- Saputro, S., Yoshimura, K., Takehara, K., Matsuoka, S. (2012). Analytical methods of chlorine and the substances produced by the chlorine treatments. En Mangione, R., Carlyle, D. (Eds.) *Chlorine: Properties, Applications and Health Effects* (Cap. 8). Nova Science Publishers, Inc.
- Sari, Y.W., Bruins, M.E., Sanders, J.P. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. *Industrial Crops and Products*, 43, 78-83. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.07.014>.
- Saxena, G., Purchase, D., Bharagava, R.N. (2020). Environmental hazards and toxicity profile of organic and inorganic pollutants of tannery wastewater and bioremediation approaches. En Saxena, G., Bharagava, R.N. (Eds.). *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety* pp. 381-398. Springer.
- Schutysse, M.A.I., van der Goot, A.J. (2011). The potential of dry fractionation processes for sustainable plant protein production. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (4), 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.006>.
- Shah, A.D., Dotson, A.D., Linden, K.G., Mitch, W.A. (2011). Impact of UV disinfection combined with chlorination/chloramination on the formation of halonitromethanes and haloacetonitriles in drinking water. *Environmental Science & Technology*, 45 (8), 3657-3664. <https://doi.org/10.1021/es104240v>.
- UNESCO, M., Khalid, S., Murtaza, B., Anwar, H., Shah, A. H., Sardar, A., Shabbir, Z., Niazi, N.K. (2020). A critical analysis of wastewater use in agriculture and

- associated health risks in Pakistan. *Environmental Geochemistry and Health*.
<https://doi.org/10.1007/s10653-020-00702-3>.
- Shahedi, A., Darban, A.K., Taghipour, F., Jamshidi-Zanjani, A. (2020). A review on industrial wastewater treatment via electrocoagulation processes. *Current Opinion in Electrochemistry*, 22, 154-169. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.05.009>.
- Shannon, M. A., Bohn, P.W., Elimelech, M., Georgiadis, J.G., Mariñas, B.J., Mayes, A.M. (2008). Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452, 301-310. <https://doi.org/10.1038/nature06599>.
- Sharma, N., Mohapatra, S., Padhye, L.P., Mukherji, S. (2021). Role of precursors in the formation of trihalomethanes during chlorination of drinking water and wastewater effluents from a metropolitan region in western India. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101928. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101928>.
- Sharma, V.K., Yu, X., McDonald, T.J., Jinadatha, C., Dionysiou, D.D., Feng, M. (2019). Elimination of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV-based treatment of drinking water: a mini review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1122-7>.
- Shrivastava, V., Ali, I., Marjub, M.M., Rene, E.R., Soto, A.M.F. (2022). Wastewater in the food industry: Treatment technologies and reuse potential. *Chemosphere*, 293, 133553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133553>.
- Simpson, A.M.A., Mitch., W.A. (2022). Chlorine and ozone disinfection and disinfection byproducts in postharvest food processing facilities: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52 (11), 1825-1867. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1862562>.

- Singleton, V.L, Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158. <http://www.ajevonline.org/content/16/3/144.full.pdf+html>.
- Sinha, R., Gupta, A.K., Ghosal, P.S. (2021). A review on trihalomethanes and haloacetic acids in drinking water: Global status, health impact, insights of control and removal technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (6), 106511. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106511>.
- Sisquella, M., Casals, C., Viñas, I., Teixidó, N., Usall, J. (2013). Combination of peracetic acid and hot water treatment to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.003>.
- Small, D.A., Chang, W., Toghrol, F., Bently, W.E. (2007). Comparative global transcription analysis of sodium hypochlorite, peracetic acid, and hydrogen peroxide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1093-1105. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1072-z>.
- Sode, F. (2019). Analytical methods for peroxy acids- a review. *Analytical Methods*, 11, 3372-3380. <https://doi.org/10.1039/c9ay00860h>.
- Souaya, E.M., Abdullah, A.M., Mossad, M. (2015). Factors affecting on formation of DBPs in greater cairo drinking water. *Organic Chemistry Current Research*, 4, 2, <https://doi.org/10.4172/2161-0401.s5-002>.
- Spahl, R.J. (2012). *FCE™: Groundbreaking measurement of free chlorine disinfecting power in a handheld instrument*. A Myron L Company White Paper. https://www.myronl.com/wp-content/themes/myron_1_theme/dl/fcetr.pdf.

- Srivastav, A.L., Patel, N., Chaudhary, V.K. (2020). Disinfection by-products in drinking water: Occurrence, toxicity and abatement. *Environmental Pollution*, 267, 115474. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115474>.
- Stampi S., De Luca G., Zanetti F. (2001). Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 833-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01451.x>.
- Stanford, B.D., Pisarenko, A.N., Dryer, D.J., Ziegler-Holady, J.C., Gamage, S., Quinones, O., Vanderford, B.J., Dickenson, E.R.V. (2013). Chlorate, perchlorate, and bromate in onsite-generated hypochlorite systems. *Journal of American Water Works Association*, 105 (3) E93. <http://dx.doi.org/10.5942/jawwa.2013.105.0014>
- Stefán, D., Erdélyi, N., Izsák, B., Záray, G., Vargha, M. (2019). Formation of chlorination by-products in drinking water treatment plants using breakpoint chlorination. *Microchemical Journal*, 149, 104008. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104008>.
- Strathmann, H. (2001). Membrane separation processes: Current relevance and future opportunities. *AIChE Journal*, 47, 1077-1087. <https://doi.org/10.1002/aic.690470514>.
- Sully, B.D., Williams, P.L. (1962). The analysis of solutions of per-acids and hydrogen peroxide. *Analyst*, 87, 653-657. <https://doi.org/10.1039/AN9628700653>.
- Sun, X., Chen, M., Wei, D., Du, Y. (2019). Research progress of disinfection and disinfection by-products in China. *Journal of Environmental Science*, 81, 52-67. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.02.003>.

- Suslow, T. (1997). Postharvest chlorination: Basic properties & key points for effective distribution. Publication No. 8003. Agriculture and Natural Resources, University of California. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8003>.
- Suslow, T. (2001). Water disinfection: a practical approach to calculating dose values for preharvest and postharvest applications. Agriculture and Natural Resources, University of California. <https://doi.org/10.3733/ucanr.7256>.
- Suslow, T. (2004). Oxidation-reduction potential (orp) for water disinfection monitoring, control, and documentation. Agriculture and Natural Resources, University of California. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8149>.
- Swanson, B.G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 276-280. <https://doi.org/10.1007/BF02539676>.
- Sýs, V., Fošumpaur, P., Kašpar, T. (2021). The impact of climate change on the reliability of water resources. *Climate*, 9 (11), 153. <https://doi.org/10.3390/cli9110153>.
- Tak, S., Vellanki, B.P., Ahuja, S. (2020). A review on disinfection and disinfection byproducts. En Ahuja, S., Loganathan, B.G. (Eds.). *Contaminants in Our Water: Identification and Remediation Methods*. (Cap. 6). ACS Symposium Series. American Chemical Society.
- Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K. (2000). Determination of haloacetic acids in water by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Analyst*, 125 1097-1102. <https://doi.org/10.1039/B002576N>.
- Tang, Y., Long, X., Wu, M., Yang, S., Gao, N., Xu, B., Dutta, S. (2020). Bibliometric review of research trends on disinfection by-products in drinking water during

- 1975–2018. *Separation and Purification Technology*, 241, 116741.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116741>.
- Tao, L., Kramer, P.M., Ge R., Pereira, M.A. (1998). Effect of dichloroacetic acid and trichloroacetic acid on DNA methylation in liver and tumors of female B6C3F1 mice. *Toxicological sciences*, 43, 139-144.
<https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2449>.
- Tapera, M. (2019). Towards greener preservation of edible oils: a minireview. *Asian Journal of Applied Chemistry Research*, 4 (1), 1-8.
<https://doi.org/10.9734/ajacr/2019/v4i1-230105>.
- Teng, Z., Luo, Y., Alborzi, S., Zhou, B., Chen, L., Zhang, J., Zhang, B., Millner, P., Wang, Q. (2018). Investigation on chlorine-based sanitization under stabilized conditions in the presence of organic load. *International Journal of Food Microbiology*, 2 (266), 150-157.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.027>.
- Teng, Z., Luo, Y., Zhou, B., Wang, Q., Hapeman. C.J. (2021). Characterization and mitigation of chemical oxygen demand and chlorine demand from fresh produce wash water. *Food Control*, 127,108112.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108112>.
- Thirumalini, S., Joseph, K. (2009). Correlation between electrical conductivity and total dissolved solids in natural waters. *Malaysian Journal of Science* 28 (1), 55-6.
<https://doi.org/10.22452/mjs.vol28no1.7>.
- Truchado, P., Garre, A., Gil, M.I., Simón-Andreu, P.J., Sánchez, G., Allende, A. (2021b). Monitoring of human enteric virus and coliphages throughout water reuse system of wastewater treatment plants to irrigation endpoint of leafy greens. *Science of*

- the Total Environment*, 782, 146837.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146837>.
- Truchado, P., Gil, M.I., Allende, A. (2021a). Peroxyacetic acid and chlorine dioxide unlike chlorine induce viable but non-culturable (VBNC) stage of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in wash water. *Food Microbiology*, 100, 103866. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103866>
- Tsoukala, A., Papalamprou, E., Makri, E., Doxastakis, G., Braudo, E.E. (2006). Adsorption at the air-water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 203-208. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.08.019>.
- Tudela, J.A., López-Gálvez, F., Allende, A., Gil, M.I. (2019b). Chlorination management in commercial fresh produce processing lines. *Food Control*, 106, 106760. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106760>.
- Tudela, J.A., López-Gálvez, F., Allende, A., Hernández, N., Andújar, S., Marín, A., Garrido, Y., Gil, M.I. (2019a). Operational limits of sodium hypochlorite for different fresh produce wash water based on microbial inactivation and disinfection by-products (DBPs). *Food Control*, 104, 300-307, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.005>.
- Turco, I., Ferretti, G., Bacchetti, T. (2016). Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55, 283-293.
- Tzitzikas, E.N., Vincken, J.P., De Groot, J., Gruppen, H., Visser, R.G.F. (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 425-433. <https://doi.org/10.1021/jf0519008>.

- Udugama, I.A., Petersen, L.A., Falco, F.C., Junicke, H., Mitic, A., Alsina, X.F., Mansouri, S. S., Gernaey, K.V. (2020). Resource recovery from waste streams in a water-energy-food nexus perspective: Toward more sustainable food processing. *Food and Bioproducts Processing*, 119, 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.10.014>.
- UE. (2000). Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2000/60/CE del parlamento europeo y del consejo, de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. L327/1 a L327/73. <https://www.boe.es/doue/2000/327/L00001-00073.pdf>.
- UE. (2010). Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2010/75/ue del parlamento europeo y del consejo de 24 de noviembre de 2010 sobre las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación) (versión refundida). L334/17 a L334/119. <https://www.boe.es/doue/2010/334/L00017-00119.pdf>.
- UE. (2019). Diario Oficial de la Unión Europea. Decisión de Ejecución (UE) 2019/2031 de la Comisión de 12 de noviembre de 2019 por la que se establecen las conclusiones sobre las mejores técnicas disponibles (MTD) en las industrias de alimentación, bebida y leche, de conformidad con la Directiva 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo. L313/60 a L313/93. <https://www.boe.es/doue/2019/313/L00060-00093.pdf>.
- UE. (2020a). Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (versión refundida). L435/1 a L435/62. <https://www.boe.es/doue/2020/435/L00001-00062.pdf>.
- UE. (2020b). Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2020/741 del parlamento europeo y del consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos

- mínimos para la reutilización del agua (Texto pertinente a efectos del EEE). L177/32 a L177/55. <https://www.boe.es/doue/2020/177/L00032-00055.pdf>.
- UE. (2020c). Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2020/749 de 4 de junio de 2020, que modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de clorato en determinados productos (Texto pertinente a efectos del EEE). L 178/7 a L178/20. <https://www.boe.es/doue/2020/178/L00007-00020.pdf>.
- UNESCO (2009). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *World Water Development Report 3, Water in a Changing World*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000181993>.
- UNESCO (2014). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *World Water Development Report, Water and Energy, Volume 1*. <http://unesdoc.unesco.org/images/0022/002257/225741e.pdf>.
- UNESCO (2015). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *World Water Development Report, Water for a Sustainable World*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000231823>.
- UNESCO (2016). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *World Water Development Report, Water and Jobs*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000243938>.
- UNESCO (2017). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *Wastewater: the untapped resource*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247153>.
- UNESCO (2021). Organización de las Naciones para la Educación, la Ciencia y la Cultura. *World Water Development Report, Valuing Water*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000375724/>.

- USEPA. (1990). United States Environmental Protection Agency. *Method 551.1 Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture detection*. Rev. 1. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-551.1.pdf>.
- USEPA. (1993). United States Environmental Protection Agency. *Method 300.1 determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography*. Rev. 1. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-300.1.pdf>.
- USEPA. (1995a). United States Environmental Protection Agency. *Method 502.2 Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas chromatography with photoionization and electrolytic conductivity detectors in series*. Rev. 2.1. https://settek.com/documents/EPA-Methods/PDF/502_2.pdf.
- USEPA. (1995b). United States Environmental Protection Agency. *Method 524.2 Measurement of purgeable organic compounds in water by capillary column gas chromatography/mass spectrometry*. Rev. 4.1. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-06/documents/epa-524.2.pdf>.
- USEPA. (1998). United States Environmental Protection Agency. *National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection byproducts*. Federal Register, 63, N° 241: 69390-69476. Washington DC. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1998-12-16/pdf/FR-1998-12-16.pdf>.
- USEPA. (2003). United States Environmental Protection Agency. *Method 552.3 Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection*. Revision 1.0. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/901V0400.TXT?ZyActionD=ZyDocumen>

t&Client=EPA&Index=2000+Thru+2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C00thru05%5CTxt%5C00000011%5C901V0400.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-
 &MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL.

USEPA. (2006). United States Environmental Protection Agency. *National primary drinking water regulations: Stage 2 disinfectants and disinfection byproducts*. Federal Register 71, No. 2, 387-493. Washington DC. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P100A2D4.txt>.

USEPA. (2009). United States Environmental Protection Agency. *Method 557 Determination of Haloacetic Acids Bromate and Dalapon in Drinking Water by Ion Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (IC-ESI-MS/MS)*.

<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1005OKO.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2006+Thru+2010&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C06thru10%5CTxt%5C00000012%5CP1005OKO.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C->

&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeeKPage=x&ZyPURL.

- Urbansky E.T., Magnuson M.L. (2002). Analyzing drinking water for disinfection byproducts. *Analytical Chemistry*, 1, 74(9), 260A-267A. <https://doi.org/10.1021/ac022009k>.
- Uzun, H., Kim, D., Karanfil, T. (2019). Removal of wastewater and polymer derived Nnitrosodimethylamine precursors with integrated use of chlorine and chlorine dioxide. *Chemosphere* 216, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.088>.
- Valta, K., Moustakas, K., Sotiropoulos, A., Malamis, D., Haralambous, K.J. (2016). Adaptation measures for the food and beverage industry to the impact of climate change on water availability. *Desalination & Water Treatment*, 57 (5), 2336-2343. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1049407>.
- Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Van Gestel, T., Doyen, W., Leysen, R. (2003). A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production. *Environmental Progress*, 22, 46-56. <https://doi.org/10.1002/ep.670220116>.
- Van Haute, S., Sampers, I., Holvoet, K., Uyttendaele, M. (2013). Physicochemical quality and chemical safety of chlorine as a reconditioning agent and wash water disinfectant for fresh-cut lettuce washing. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (9), 2850-2861. <https://doi.org/10.1128/AEM.03283-12>.
- Van Haute, S., Tryland, I., Escudero, C., Vanneste, M., Sampers, I. (2017). Chlorine dioxide as water disinfectant during fresh-cut iceberg lettuce washing: disinfectant

- demand, disinfection efficiency, and chlorite formation. *LWT - Food Science & Technology*, 75, 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.002>.
- Van Haute, S., Uyttendaele, M., Sampers, I. (2015). Coagulation of turbidity and organic matter from leafy vegetable wash-water using chitosan to improve water disinfectant stability. *LWT - Food Science & Technology*, 64, 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.063>.
- Van Haute, S., Zhou, B., Luo, Y., Sampers, I., Vanhaverbeke, M., Millner, P. (2019). The use of redox potential to estimate free chlorine in fresh produce washing operations: Possibilities and limitations. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110957. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110957>.
- Van Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J.E., Wolff, J. (2003). Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*, 144 (1), 247-252. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220744>.
- Vandekinderen, I., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Ragaert, P., Van Camp, J. (2009). Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiology*, 26 (8), 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.004>.
- Varoquaux, P., Mazollier, J. (2002). Overview of the European fresh-cut produce industry. En Lamikanra, O (Ed.). *Fresh-cut Fruits Vegetables: Science Technology Market*. pp. 21-43. CRC Press, Boca Raton.
- Villanueva, C.M., Gracia-Lavedan, E., Bosetti, C., Righi, E., Molina, A.J., Martín, V., y col. (2016). Colorectal cancer and long-term exposure to trihalomethanes in drinking water: a multicenter case-control study in Spain and Italy. *Environmental Health Perspectives*, 125 (1), 56-65. <https://doi.org/10.1289/EHP155>.

- Von Gunten, U. (2003). Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37 (7), 1469-1487. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00458-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00458-X).
- Vose, J.R. (1980). Production and functionality of starches and protein isolates from legume seeds Field peas (*Pisum sativum* cultivar trapper) and Horse beans (*Vicia Faba-equina* cultivar Diana). *Cereal Chemistry*, 57, 406-410. https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1980/Documents/chem57_406.pdf.
- Wagner, E.D., Plewa, M.J. (2017). CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. *Journal of Environmental Sciences*, 58, 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.021>.
- Wagner, M., Brumelis, D., Gehr, R. (2002). Disinfection of wastewater by hydrogen peroxide or peracetic acid: development of procedures for measurement of residual disinfectant and application to a physicochemically treated municipal effluent. *Water Environment Research*, 74, 33-50. <https://doi.org/10.2175/106143002X139730>.
- Wang, C., Moore, N., Bircher, K., Andrews, S., Hofmann, R. (2019). Full-scale comparison of UV/H₂O₂ and UV/Cl₂ advanced oxidation: the degradation of micropollutant surrogates and the formation of disinfection byproducts. *Water Research*, 161, 448-458. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.033>.
- Wang, H., Liu, D.M., Zhao, Z.W Cui, F.Y., Zhu, Q., Liu, T.M. (2010). Factors influencing the formation of chlorination brominated trihalomethanes in drinking water. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 11, 143-150. <https://doi.org/10.1631/jzus.A0900343>.

- Wang, J., Jia, R., Zheng, X., Sun, Z., Liu, R., Zong, W. (2018). Drinking water disinfection byproduct iodoacetic acid interacts with catalase and induces cytotoxicity in mouse primary hepatocytes. *Chemosphere* 210, 824-830. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.061>.
- Wang, W., Moe, B., Li, J., Qian, Y., Zheng, Q., Li, X.F. (2016a). Analytical characterization, occurrence, transformation, and removal of the emerging disinfection byproducts halobenzoquinones in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 85, 97-110. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.004>.
- Wang, W.L., Wu, Q.-Y., Huang, N., Wang, T., Hu, H.-Y. (2016b). Synergistic effect between UV and chlorine (UV/chlorine) on the degradation of carbamazepine: influence factors and radical species. *Water Research*, 98, 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.015>.
- Wang, Y., Luo, C., Yang, M., Ren, J., Wang, W., Yong, L., Gao, G., Ren, L., Xiaoli, Z. (2020). Target quantification and semi-target screening of halogenated carboxylic acids in drinking water using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1614, 460710. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460710>.
- Wang, Y.W., Liao, M.S., Shu, C.M. (2015). Thermal hazards of a green antimicrobial peracetic acid combining DSC calorimeter with thermal analysis equations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 119, 2257-2267. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4369-z>.
- Warsame, A.O., O'Sullivan, D.M., Tosi, P. (2018). Seed Storage Proteins of Faba Bean (*Vicia faba L*): Current Status and Prospects for Genetic Improvement. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 66 (48), 12617-12626.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04992>.
- Warsinger, D.M., Chakraborty, S., Tow, E.W., Plumlee, M.H., Bellona, C., Loutatidou, S., Karimi, L., Mikelonis, A.M., Achilli, A., Ghassemi, A., Padhye, L.P., Snyder, S.A., Curcio, S., Vecitis, C.D., Arafat, H.A., Lienhard, J.H. (2018). A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse. *Progress in Polymer Science*, 81, 209-237. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.01.004>.
- Watts, R.J., Richter, B.D., Opperman, J.J., Bowmer, K.H. (2011). Dam Reoperation in an Era of Climate Change. *Marine & Freshwater Research*, 62, 321-327.
<https://doi.org/10.1071/MF10047>.
- Wawryk, N.J.P., Craven, C.B., Blackstock, L.K.J., Li, X.J. (2021). New methods for identification of disinfection byproducts of toxicological relevance: Progress and future directions. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 151-159.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.020>.
- Weng, S., Luo, Y., Li, J., Zhou, B., Jacangelo, J.G., Schwab, K.J. (2016). Assessment and speciation of chlorine demand in fresh-cut produce wash water. *Food Control*, 60, 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.031>.
- Westerhoff, P., Chao, P., Mash, H. (2004). Reactivity of natural organic matter with aqueous chlorine and bromine. *Water Research*, 38, 1502-1513,
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.014>.
- White, C. W., Martin, J.G. (2010). Chlorine gas inhalation: Human clinical evidence of toxicity and experience in animal models. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7, 257-263. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-008SM>.
- WHO IARC. (2011). World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some*

- chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking water.*
Vol. 101. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono101.pdf>.
- WHO IARC. (2014). World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Trichloroethylene, Tetrachloroethylene, and Some Other Chlorinated Agents.* Vol. 106. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono106.pdf>.
- WHO IARC. (2017). World Health Organization International Agency for Research on Cancer. *Agents classified by the IARC monographs. Volumes 1-123 CAS No. Agent 0 B 0 B 0 B Group Volume Year 1-37.*
- WRI. (2019). World Resources Institute. *17 Countries, Home to One-Quarter of the World's Population, Face Extremely High Water Stress.* Acceso el 29 de marzo de 2022 en <https://www.wri.org/insights/17-countries-home-one-quarter-worlds-population-face-extremely-high-water-stress>.
- Wright, J.M., Evans, A., Kaufman, J.A., Rivera-Núñez, Z., Narotsky, M.G. (2017a). Disinfection by-product exposures and the risk of specific cardiac birth defects. *Environmental Health Perspectives*, 125 (2), 269-277. <https://doi.org/10.1289/EHP103>.
- Wright, P. Kahler, B. and Walsh, L.J. (2017b). Alkaline sodium hypochlorite irrigant and its chemical interacciones. *Materials*, 10 (10), 1147. <https://doi.org/10.3390/ma10101147>.
- Xanthakis, E., Theodosiou, E., Magkouta, S., Stamatis, H., Loutrari, H., Roussos, C., Kolisis, F. (2010). Enzymatic transformation of flavonoids and terpenoids:

- Structural and functional diversity of the novel derivatives. *Pure and Applied Chemistry*, 82, 1-16. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-01-19>.
- Xiang, W., Xiang, J., Zhang, J., Wu, F., Tang, J. (2005). Geochemical transformation of trichloroacetic acid to chloroform in fresh waters -the results based upon laboratory experiments. *Water, Air and Soil Pollution*, 168, 289-312. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-1776-6>.
- Xie, Y. (2003). *Disinfection Byproducts in Drinking Water: Formation, Analysis, and Control*. CRC Press. Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780203486917>.
- Xu, L., Lamb, K., Layton, L., Kumar, A. (2004). A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing. *Food Research International*, 37, 867-874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.004>.
- Yang, M., Zhang, X. (2016). Current trends in the analysis and identification of emerging disinfection byproducts. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 10, 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2016.03.002>.
- Yang, M., Zhang, X., Liang, Q., Yang, B. (2019a). Application of (LC/) MS/MS precursor ion scan for evaluating the occurrence, formation and control of polar halogenated DBPs in disinfected waters: a review. *Water Research*, 158, 322-337. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.033>.
- Yang, M., Liberatore, H.K., Zhang, X. (2019b). Current methods for analyzing drinking water disinfection byproducts. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 7, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.12.006>.
- Ye, B., Cang, Y., Li, J., Zhang, X. (2019). Advantages of a ClO₂/NaClO combination process for controlling the disinfection by-products (DBPs) for high algae-laden water. *Environmental Geochemistry and Health*, 41, 1545-1557. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0231-8>

- Yeom, Y., Han, J., Zhang, X., Shang, C., Zhang, T., Li, X., Duan, X., Dionysiou, D.D. (2021). A review on the degradation efficiency, DBP formation, and toxicity variation in the UV/chlorine treatment of micropollutants. *Chemical Engineering Journal*, 424, 130053. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130053>.
- Zagory, D. (1999). Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*, 15 (3), 313-321. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00093-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00093-3).
- Zhai, H., Zhang, X., Zhu, X., Liu, J., Ji, M. (2014). Formation of brominated disinfection byproducts during chloramination of drinking water: new polar species and overall kinetics. *Environmental Science & Technology*, 48 (5), 2579-2588. <https://doi.org/10.1021/es4034765>.
- Zhang, D., Chu, W., Yu, Y., Krasner, S.W., Pan, Y., Shi, J., Yin, D., Gao, N. (2018). Occurrence and stability of chlorophenylacetoneitriles: a new class of nitrogenous aromatic DBPs in chlorinated and chloraminated drinking waters. *Environmental Science & Technology Letters*, 5 (6), 394-399. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00220>.
- Zhang, T., Hu, Y., Jiang, L., Yao, S., Lin, K., Zhou, Y., Cui, C. (2019a). Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water. *Chemical Engineering Journal*, 358, 589-597. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.09.218>.
- Zhang, T., Huang, C.H. (2020a). Simultaneous quantification of peracetic acid and hydrogen peroxide in different water matrices using HPLC-UV. *Chemosphere*, 257, 127229. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127229>.

- Zhang, T., Huang, C. H. (2020b). Modeling the Kinetics of UV/Peracetic Acid Advanced Oxidation Process. *Environmental Science Technology*, 54, 7579-7590. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06826>.
- Zhang, T., Lee, W.N., Luo, Y., Huang, C.H. (2022). Flume and single-pass washing systems for fresh-cut produce processing: Disinfection by-products evaluation. *Food Control*, 133, 108578. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108578>.
- Zhang, T., Xu, Q., Shi, Y.L., Chen, Z., Lu, Y., Yang, H.W., Xie, Y.F., Hou, L. (2021). Study on the influence of operational and management processes of a water reclamation plant since COVID-19 situation. *Environmental Pollution*, 285, 117257. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117257>.
- Zhang, X., Minear, R.A., Guo, Y., Hwang, C.J., Barrett, S.E., Ikeda, K., Shimizu, Y., Matsui, S. (2004). An electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for identifying chlorinated drinking water disinfection byproducts. *Water Research*, 38, 3920-3930. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.022>.
- Zhang, X., Saini, C., Pohl, C., Liu, Y. (2020b). Fast determination of nine haloacetic acids, bromate and dalapon in drinking water samples using ion chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461052. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461052>.
- Zhang, X., Yang, H., Wang, X., Karanfil, T., Xie, Y. (2015). Trihalomethane hydrolysis in drinking water at elevated temperatures. *Water Research*, 78, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.027>.
- Zhang, X., Yang, Y.J., Zhang, J., Yang, Y., Shen, F., Shen, J.Z., Shao, B. (2019b). Determination of emerging chlorinated byproducts of diazepam in drinking water. *Chemosphere* 218, 223-231. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.076>.

- Zhang, Y., Chu, W., Yao, D., Yin, D. (2017). Control of aliphatic halogenated DBP precursors with multiple drinking water treatment processes: formation potential and integrated toxicity. *Journal of Environmental Sciences*, 58, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.03.028>.
- Zhang, Z., Zhu, Q., Huang, C., Yang, M., Li, J., Chen, Y., Yang, B., Zhao, X. (2020a). Comparative cytotoxicity of halogenated aromatic DBPs and implications of the corresponding developed QSAR model to toxicity mechanisms of those DBPs: binding interactions between aromatic DBPs and catalase play an important role. *Water Research*, 170, 115283. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115283>.
- Zhao, X., Zhang, T., Zhou, Y., Liu, D. (2007). Preparation of peracetic acid from hydrogen peroxide: part I: kinetics for peracetic acid synthesis and hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 271, 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2007.03.012>.
- Zhong, Y., Gan, W., Du, Y., Huang, H., Wu, Q., Xiang, Y.Y., Shang, C., Yang, X. (2019). Disinfection byproducts and their toxicity in wastewater effluents treated by the mixing oxidant of ClO_2/Cl_2 . *Water Research*, 162, 471-481. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.012>.
- Zoellner, C., Aguayo-Acosta, A., Mohammed, M.W., Dávila-Aviña, J.E. (2018). Peracetic acid in disinfection of fruits and vegetables. En Mohammed, M.W (Ed.). *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*. pp. 53-66. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00002-9>.
- Zoschke, K., Börnick, H., Worch, E. (2014). Vacuum-UV radiation at 185 nm in water treatment-A review. *Water Research*, 52, 131-145. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.12.034>.

Zwiener, C., Richardson, S.D. (2005). Analysis of disinfection by-products in drinking water by LC–MS and related MS techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 613-621. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.03.014>.