

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE
EXTRACCIÓN CON DISOLVENTE PRESURIZADO DE
DERIVADOS DE ALQUILFENOLES EN BIOSÓLIDOS Y
SUELOS. APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN Y
MOVILIDAD”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Química por:

ADOLFO ANDRÉS MARICÁN RIQUELME

Directores de Tesis

Dr. Pablo Richter D.
MSc. Inés Ahumada T.

SANTIAGO – CHILE
2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

ADOLFO ANDRÉS MARICÁN RIQUELME

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Pablo Richter Duk. _____

MSc. Inés Ahumada Torres. _____

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Marcelo Campos (Presidente) _____

Dra. Verónica Arancibia _____

Dr. Mauricio Isaacs _____

Dr. Mehrdad Yasdani _____

*Pull me under, I'm not afraid
All that I feel is honor and spite
All I can do is to set it right...
(Dream Theater. Pull Me Under)*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dr. Pablo Richter y a mi profesora de siempre, MSc. Inés Ahumada, por su paciencia, estímulos y confianza, que de una u otra forma ayudaron a la realización de esta tesis. Siempre los recordaré con el mayor de los cariños, porque a su manera, ambos contribuyen a amalgamar lo mejor de cada uno de los estudiantes, en nuestro periplo por el laboratorio.

Se agradece a la comisión encargada de evaluar y calificar este proyecto de tesis, conformada por: Dr. Marcelo Campos (Presidente), Dra. Verónica Arancibia, Dr. Mauricio Isaacs y Dr. Mehrdad Yasdani, por su colaboración y sugerencias para el desarrollo de ésta.

A CONICYT, por las becas de doctorado y de término de tesis, financiamiento sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A los proyectos FONDECYT 1070616 y 1080357, por el financiamiento de esta investigación.

Al Instituto de Salud Pública, departamento de Salud Ambiental, Subdepartamento del Ambiente, por las facilidades concedidas en la utilización de un equipo GC-MSD, indispensable para la realización de esta tesis.

A mi esposa Sandra, por su paciencia, cariño y amor, durante todos estos años.

A Loreto, Ady, Jorge, Mauricio, Claudio, Catalina, y Carlos, compañeros y amigos de laboratorio, por el buen humor, disposición, cooperación y complicidad en esas largas jornadas de trabajo experimental, y por su compañía cuando fumábamos un cigarrillo en el patio, que nos hacía más leve el día a día.

Al Dr. Claudio Olea, por su apoyo, confianza y simpatía, durante mi estancia como ayudante de laboratorio, y en especial en mis primeros años de doctorado.

Al Dr. Edwar Fuentes, por su paciencia y disposición.

A Christian González y Mauricio Retamal, por las largas noches de estudio.

Al personal del CEPEDEQ, en especial a Betsabet “Súper Betsa” Sepúlveda, y Carolina Acuña, por su apoyo en la cromatografía y en el préstamo de reactivos “urgentes”.

Al Sr. Marcelo Soto, por su colaboración, disposición, amistad y buen humor, durante el trabajo cromatográfico.

RESUMEN

Los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales, por sus características, pueden ser reutilizados en la agricultura, como mejoradores de suelos o reemplazo parcial de fertilizantes. Se caracterizan por tener un elevado porcentaje de materia orgánica, la cual puede interactuar con una serie de compuestos orgánicos tóxicos a niveles traza, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plaguicidas, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos (PCDD/F), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles y detergentes.

Dentro del grupo de los detergentes, se ha puesto énfasis especialmente en los etoxilatos de nonilfenol y octilfenol, y sus metabolitos, ya que son compuestos disruptores del sistema endocrino. Para su extracción se han propuesto varios métodos modernos alternativos al método tradicional de extracción Soxhlet, como la extracción por agitación ultrasónica (USE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con disolventes acelerada (ASE) y extracción asistida por microondas (MAE o MASE), entre otras que han demostrado tener recuperaciones similares o mejores que la extracción Soxhlet. Estas metodologías tienen grandes ventajas comparativas con respecto a la extracción Soxhlet, como la rapidez en completar la extracción, y la menor cantidad de disolvente extractante y de muestra que son necesarios.

En este estudio se propone el desarrollo de un método de determinación de etoxilatos de alquilfenoles y sus derivados en muestras de biosólidos, que incremente la eficiencia y rapidez en las etapas de preparación de la muestra,

respecto de un sistema de extracción Soxhlet, incorpore energía adicional (temperatura-presión del disolvente), que asista el proceso de extracción. Asimismo, se busca la optimización de las variables para la extracción de etoxilatos de alquilfenol y sus metabolitos, nonilfenol y octilfenol, desde biosólidos, y desde suelos enmendados con biosólidos, mediante el empleo de modelos de diseño estadístico, a través del análisis multivariado. De esta forma, se integrarán las ventajas y posibilidades que ofrecen las metodologías innovadoras de preparación de muestra y la detección por GC-MS en sus diferentes modalidades, permitiendo de este modo la obtención de métodos analíticos de preparación de muestra más ventajosos, respecto de métodos más tradicionales, en términos de exactitud, precisión y rapidez.

La metodología de extracción con disolventes presurizados en batch (ASE), fue la que presentó mejores recuperaciones. Las condiciones óptimas para esta metodología fueron: 129 °C, 34 minutos por ciclo, en dos ciclos, y disolvente de extracción, acetona. Comparativamente con la extracción Soxhlet, esta metodología optimizada resultó ser más eficiente, en cuanto al tiempo de extracción y cantidad de disolvente. La extracción de los analitos en estudio, por ambas metodologías fue: en el caso de 4-t-OP, $1,2\pm 0,1$ mg·kg⁻¹ y $1,22\pm 0,04$ mg·kg⁻¹; 4-NP, 204 ± 20 mg·kg⁻¹ y 298 ± 7 mg·kg⁻¹; 4-n-OP, 54 ± 4 mg·kg⁻¹ y $6,4\pm 0,4$ mg·kg⁻¹; 4-OPE 16 ± 1 mg·kg⁻¹ y $0,3\pm 0,1$ mg·kg⁻¹; y 4-NPE, 1053 ± 23 mg·kg⁻¹ y 621 ± 18 mg·kg⁻¹, para los sistemas ASE y Soxhlet, respectivamente. La metodología ASE optimizada tuvo mejores recuperaciones en el caso de 4-n-OP, 4-OPE y 4-NPE, mientras que la extracción Soxhlet fue mejor en el caso de 4-NP. En el caso de 4-t-OP, ambas metodologías son comparables.

Una vez optimizado el método de determinación de 4-NP y 4-NPE, se aplicó en ensayos de movilidad en columnas de lixiviación y de biodisponibilidad con plantas de trigo. Se encontró que la movilidad de 4-NP y 4-NPE mostró ser relativamente moderada. De esta forma, tanto 4-NP, como 4-NPE, presentes en el biosólido, estarían disponibles para ser absorbidos por las plantas.

La biodisponibilidad de los analitos seleccionados fue determinada mediante la extracción exhaustiva en muestras de trigo cultivado en suelo, con diferentes dosis de biosólido (B) y biosólido enriquecido (BE) con 4-NP. Los analitos encontrados en mayor concentración en el trigo son 4-NP y 4-NPE. En particular la concentración de 4-NP en trigo, varía entre $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, y la de 4-NPE entre $1,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $9,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Es posible afirmar que estos analitos estarían significativamente biodisponibles para el trigo, cultivado en suelo tratado con biosólido.

La correlación entre el contenido de 4-NP en las plantas y fracción móvil determinada a través de columnas de lixiviación, mostró correlaciones satisfactorias, tanto para la parte radicular, como para la parte aérea de la planta.

SUMMARY

The sludge from wastewater treatment plants, because of their characteristics can be reused in agricultura as soil improvers, or partial replacement of fertilizers. They are characterized by a high percentage of organic matter, which can interact with a series of toxic organic compounds at trace levels, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides, polychlorinated biphenyls(PCBs), dioxins and furans (PCDD/F), volatile organic compounds (VOCs), halogenated aliphatic compounds, phenols and detergents.

Within the group of detergents, emphasis has been placed in nonylphenol and octylphenol ethoxylates, and their metabolites, because they are endocrine-disrupting compounds.

For extraction, have been proposed several modern methods, alternative to Soxhlet extraction method, such as ultrasonic agitation extraction (USE), supercritical fluid extraction (SFE), accelerated solvent extraction (ASE) and microwave assisted extraction (MAE or MASE), among others that have shown similar or better recoveries than Soxhlet extraction. These methods have great advantages over Soxhlet extraction, as the speed to complete the extraction, and the least amount of extracting solvent and simple that are required.

This study proposes the development of a method of determination of alkylphenol ethoxylates and their derivatives in samples of biosolids, to increase efficiency and speed in the early stages of sample preparation as compared to Soxhlet extraction system, to incorporate additional energy (temperature-pressure solvent), to assist the extraction process. It also seeks to optimize the variables for the extraction

of alkylphenol ethoxylates and their metabolites, nonylphenol and octylphenol, from biosolids and from soils amended with biosolids, using statistical design models through multivariate analysis. In this way, will integrate the advantages and potential of innovative methods of sample preparation and detection by GC-MS in its various forms, thereby enabling the collection of analytical methods for sample preparation, more advantageous than traditional methods in terms of accuracy, precision and speed.

The accelerated solvent extraction (ASE), was the one that showed better recoveries. The optimum conditions for this methodology were: 129 °C, 34 minutes per cycle, two cycles, and solvent extraction, acetone. Compared with Soxhlet extraction, the optimized methodology was more efficient, in terms of time and amount of solvent extraction. The extraction of the analytes under study by both methods was, in the case of 4-t-OP, $1,2 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $1,22 \pm 0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 4-NP, $204 \pm 20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $298 \pm 7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 4-n-OP, $54 \pm 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $6,4 \pm 0,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 4-OPE $16 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $0,3 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; and 4-NPE, $1053 \pm 23 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $621 \pm 18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, for ASE and Soxhlet systems, respectively. The ASE optimized methodology, had best recoveries in the case of 4-n-OP, 4-OPE and 4-NPE, while the Soxhlet extraction was better in the case of 4-NP. In the case of 4-t-OP, both methods are comparable.

Once optimized the method of determination of 4-NP and 4-NPE, it was applied on leaching columns mobility essays and bioavailability to wheat plants. It was found that the mobility of 4-NP and 4-NPE proved to be relatively moderate. Thus, both 4-NP, and 4-NPE, present in the biosolids would be available to be absorbed by plants.

The bioavailability of selected analytes was determined by exhaustive extraction in samples of wheat plants grown in soils treated with different doses of biosolid (B) and biosolid enriched (BE) with 4-NP.

Analytes found in higher concentrations in wheat are 4-NP y 4-NPE. In particular the concentration of 4-NP in wheat, varies between $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the concentration of 4-NPE varies between $1,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $9,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Arguably, these analytes would be significantly bioavailable for wheat grown in soil treated with biosolid.

The correlation between the content of 4-NP in plants and mobile fraction determined by leaching columns showed satisfactory correlations for both the root and aerial parts of the plant.

INDICE DE CONTENIDOS

I.INTRODUCCIÓN	1
II.HIPÓTESIS	11
III.OBJETIVOS	12
III.1. OBJETIVO GENERAL.....	12
III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
IV.1. MATERIALES Y REACTIVOS	14
IV.1.1. ESTÁNDARES.....	14
IV.1.2. DISOLVENTES.....	14
IV.1.3. ADSORBENTES, DESECANTES Y SOPORTES	15
IV.1.4. MATERIAL DE VIDRIO	15
IV.1.5. SEMILLAS	15
IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA	15
IV.2.1. ELECCIÓN DE LOS ANALITOS	15
IV.2.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	16
IV.2.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	17
IV.2.4. METODOLOGÍA DE SECADO Y LIMPIEZA DE EXTRACTOS.....	18
IV.2.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LODOS	18
IV.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	19
IV.3.1. LODOS SANITARIOS.....	19
IV.3.1.1. EXTRACCIÓN SOXHLET	19
IV.4. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	20
IV.4.1. ESTUDIOS DE EXTRACTABILIDAD	20
IV.4.2. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN BATCH (ASE® 100).....	20

IV.4.3. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO	21
IV.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN	23
IV.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	23
IV.5.2. ESTUDIO DE MOVILIDAD	27
IV.5.3. BIODISPONIBILIDAD DE ETOXILATO DE NONILFENOL YNONILFENOL A TRAVÉS DE ENSAYOS DE INVERNADERO CON PLANTAS DE TRIGO (TRITICUM AESTIVUM)	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
V.1. IMPLEMENTACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO	32
V.1.1. HPLC-DAD	32
V.1.2. GC-MSD	35
V.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	38
V.3. MÉTODO DE LIMPIEZA DE EXTRACTOS	39
V.4. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE	39
V.5. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN BATCH (ASE® 100)	42
V.5.1. MEZCLAS ACETONA/DICLOROMETANO	45
V.5.2. MEZCLAS ACETONA/HEXANO	54
V.6. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO	78
V.6.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO, UTILIZANDO UN HORNO COMO FUENTE DE ENERGÍA EXTERNA	79
V.6.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO, UTILIZANDO ULTRASONIDO COMO FUENTE DE ENERGÍA EXTERNA	91
V.7. INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE BIOSÓLIDO EN LA MOVILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE ALQUILFENOLES (4-NP Y 4-NPE) EN SUELO	97
V.7.1. ESTUDIO DE MOVILIDAD	99
V.7.2. ENSAYO DE BIODISPONIBILIDAD DE ALQUILFENOLES Y DE ETOXILATOS DE ALQUILFENOL, UTILIZANDO COMO INDICADOR PLANTAS DE TRIGO	112

V.7.3. ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE ABSORCIÓN POR PLANTAS Y MOVILIDAD DE 4-NP	120
V.7.4. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE BIOSÓLIDO EN EL CRECIMIENTO DEL TRIGO.....	123
VI. CONCLUSIONES	126
VII. REFERENCIAS	129

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 – TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS (HPLC–DAD).....	32
TABLA 2 – TIEMPOS DE RETENCIÓN, IONES PRINCIPALES Y DE CONFIRMACIÓN DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS (GC–MS).....	35
TABLA 3 – DETERMINACIÓN DE LD Y LC (N=9).....	38
TABLA 4 – VALIDACIÓN MÉTODO DE LIMPIEZA DE EXTRACTOS.....	39
TABLA 5 – PRUEBA DE EXTRACTABILIDAD DE DISOLVENTES EN BATCH (N=2) 40	40
TABLA 6 – MATRIZ DE OPTIMIZACIÓN CODIFICADA.....	44
TABLA 7 – MATRIZ DE OPTIMIZACIÓN EN VALORES NATURALES.....	45
TABLA 8 – MATRIZ DE RESULTADOS, MEZCLAS ACET/DCM.....	46
TABLA 9 – RESUMEN DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.....	49
TABLA 10 – VALORES DE R ² Y CARENCIA DE AJUSTE PARA CADA ANALITO	49
TABLA 11 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA CADA COMPUESTO.....	50
TABLA 12 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA CADA GRUPO DE COMPUESTOS.....	51
TABLA 13 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA TODOS LOS COMPUESTOS AGRUPADOS.....	53
TABLA 14 – EXTRACCIÓN EN CONDICIONES ÓPTIMAS.....	54
TABLA 15 – MATRIZ DE RESULTADOS, MEZCLAS ACET/HEX.....	55
TABLA 16 – RESUMEN DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA: (+) INTERACCIÓN POSITIVA;.....	58
TABLA 17 – VALORES DE R ² Y CARENCIA DE AJUSTE PARA CADA ANALITO	58
TABLA 18 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA CADA COMPUESTO.....	59
TABLA 19 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA CADA GRUPO DE COMPUESTOS.....	63

TABLA 20 – EXTRACCIÓN 4-T-OP, 4-NP, 4-N-OP, 4-OPE Y 4-NPE EN CONDICIONES ÓPTIMAS.....	63
FIGURA 14 – COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN POR MÉTODOS EN CONDICIONES ÓPTIMAS, PARA LOS COMPUESTOS 4-NP Y 4-NPE, DESDE LODO DE REFERENCIA.....	65
TABLA 22 – ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ALGUNOS DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN.....	67
TABLA 23 – CONDICIONES Y CONSTANTES PARA ACETONA (LIDE, 2004).....	69
TABLA 24 – PERMITIVIDAD RELATIVA DEL AGUA A DISTINTAS TEMPERATURAS Y PRESIONES.....	71
TABLA 25 – RELACIÓN ENTRE LN E _R VS 1/T.....	72
TABLA 26 – PERMITIVIDAD RELATIVA DE ACETONA, A DISTINTAS PRESIONES Y TEMPERATURAS. CÁLCULO DE LA PERMITIVIDAD RELATIVA (MARSHALL, 2008), Y DENSIDAD SEGÚN EL MODELO DE YEN-WOODS (REID, 1977).....	77
TABLA 27 – MATRIZ DE OPTIMIZACIÓN CODIFICADA.....	80
TABLA 28 – MATRIZ DE OPTIMIZACIÓN EN VALORES NATURALES.....	81
TABLA 29 – MATRIZ DE RESULTADOS, MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO.....	82
TABLA 30 – RESUMEN DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA.....	85
TABLA 31 – VALORES DE R ² Y CARENCIA DE AJUSTE PARA CADA ANALITO.....	85
TABLA 32 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE DE LOS COMPUESTOS.....	86
TABLA 33 – VALORES ÓPTIMOS DE CADA VARIABLE, PARA TODOS LOS COMPUESTOS AGRUPADOS.....	90
TABLA 34 – EXTRACCIÓN POR MÉTODO DE EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO EN CONDICIONES ÓPTIMAS.....	91
TABLA 35 – EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS EN MODO HÍBRIDO, UTILIZANDO ULTRASONIDO COMO FUENTE DE ENERGÍA EXTERNA.....	93
TABLA 36 – CARACTERIZACIÓN DE SUELO Y BIOSÓLIDO.....	97
TABLA 37 – CONCENTRACIÓN TOTAL DE 4-NP Y 4-NPE EN MUESTRAS DE SUELO Y BIOSÓLIDO.....	99
TABLA 38 – CLASIFICACIÓN DE MOVILIDAD (FAO, 2000).....	101

TABLA 39 – EXTRACCIÓN DE FRACCIONES DE COLUMNAS ENMENDADAS CON BIOSÓLIDO Y BIOSÓLIDO ENRIQUECIDO CON NP	102
TABLA 40 – MATRIZ DE SCREENING CODIFICADA	105
TABLA 41 – MATRIZ DE SCREENING EN VALORES NATURALES	106
TABLA 42 – MATRIZ DE SCREENING EN VALORES NATURALES, INCLUYENDO LOS RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE 4-NP Y 4-NPE	107
TABLA 43 – RESUMEN DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA: (+) INTERACCIÓN POSITIVA; (-) INTERACCIÓN NEGATIVA; (NS) NO SIGNIFICATIVA	109
TABLA 44 – VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE LIMPIEZA EXTRACTOS DE PLANTAS (N=2)	112
TABLA 45 – CONCENTRACIÓN TOTAL DE 4-NP Y 4-NPE EN MEZCLAS SUELO-BIOSÓLIDO (N=2)	113
TABLA 46 – CONCENTRACIÓN TOTAL DE 4-NP EN MEZCLAS SUELO-BIOSÓLIDO ENRIQUECIDO	113
TABLA 47 – BIODISPONIBILIDAD DE ALQUILFENOLES EN TRIGO CULTIVADO CON BIOSÓLIDO (B) EN DOSIS DE 100 Y 200 MG·HA ⁻¹	114
TABLA 48 – BIODISPONIBILIDAD DE NONILFENOL Y ETOXILATO DE NONILFENOL EN TRIGO CULTIVADO CON BIOSÓLIDO ENRIQUECIDO CON 4-NP (BE) EN DOSIS DE 100 MG·HA ⁻¹ Y 200 MG·HA ⁻¹	116
TABLA 49 – BIODISPONIBILIDAD DE 4-NP EN TRIGO, PARA DISTINTAS DOSIS DE BIOSÓLIDO Y BIOSÓLIDO ENRIQUECIDO CON 4-NP	119
TABLA 50 – FRACCIÓN MÓVIL Y CONCENTRACIÓN DE 4-NP EN PLANTA	122

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – RUTA DE DEGRADACIÓN DE LOS ETOXILATOS DE ALQUILFENOL	6
FIGURA 2 – EXTRACTOR QUE OPERA DE MANERA HÍBRIDA (CONTINUA-DISCONTINUA).....	21
FIGURA 3 – CROMATOGRAMAS: (A) METOH; (B) 4-OPE; (C) 4-NPE; (D) 4-N-OP; (E) 4- T-OP; (F) 4-NP	33
FIGURA 4 – CROMATOGRAMA DE MEZCLA DE ESTÁNDARES.....	34
FIGURA 5 – ESPECTROS DE MASAS: (A) 4-T-OP; (B) TBA; (C) 4-NP; (D) 4-N-OP; (E) 4-OPE; (F) 4-NPE.....	36
FIGURA 6 – CROMATOGRAMA DE MEZCLA DE ESTÁNDARES: (A) 4-T-OP; (B) TBA; (C) 4-NP; (D) 4-N-OP; (E) 4-OPE; (F) 4-NPE	37
FIGURA 7 – GRÁFICOS DE PARETO ESTANDARIZADOS PARA CADA UNO DE LOS ANALITOS	48
FIGURA 8 – GRÁFICO DE PARETO ESTANDARIZADO PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	52
FIGURA 9 – SUPERFÍCIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	53
FIGURA 10 – GRÁFICOS DE PARETO ESTANDARIZADOS PARA CADA UNO DE LOS ANALITOS	56
FIGURA 11 – GRÁFICO DE PARETO ESTANDARIZADO PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	61
FIGURA 12 – SUPERFÍCIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	62
FIGURA 15 – GRÁFICO LN E _R VS 1/T, A DISTINTAS PRESIONES	73
FIGURA 16 – GRÁFICOS DE PARETO ESTANDARIZADOS PARA CADA UNO DE LOS ANALITOS	83
FIGURA 17 – GRÁFICO DE PARETO ESTANDARIZADO PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	88
FIGURA 18 – SUPERFÍCIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD DE DERRINGER (D)	89

FIGURA 19 – COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN A DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIDO, PARA LOS COMPUESTOS 4-T-OP, 4-N-OP Y 4-OPE	94
FIGURA 20 – COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN A DISTINTOS TIEMPOS DE ULTRASONIDO, PARA LOS COMPUESTOS 4-NP Y 4-NPE.....	94
FIGURA 21 – COMPARACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS 4-T-OP, 4-N-OP Y 4-NPE A TRAVÉS DE DISTINTOS MÉTODOS OPTIMIZADOS.....	95
FIGURA 22 – COMPARACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS 4-NP Y 4-NPE A TRAVÉS DE DISTINTOS MÉTODOS OPTIMIZADOS.....	96
FIGURA 23 – CONCENTRACIÓN DE 4-NP Y 4-NPE A UNA PROFUNDIDAD DE 0 A 4 CM, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.....	103
FIGURA 24 – GRÁFICOS DE PARETO ESTANDARIZADOS PARA 4-NP Y 4-NPE EXTRAÍDOS EN EL ENSAYO DE COLUMNAS DE LIXIVIACIÓN	108
FIGURA 25 – SUPERFICIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA 4-NP.....	110
FIGURA 26 – SUPERFICIE DE RESPUESTA ESTIMADA PARA 4-NPE	111
FIGURA 27 – CONTENIDO DE NONILFENOL Y ETOXILATO DE NONILFENOL EN TRIGO TRATADO CON B100 (SUELO + BIOSÓLIDO EL TREBAL EN DOSIS DE 100 MG·HA ⁻¹) Y B200 (SUELO + BIOSÓLIDO EL TREBAL EN DOSIS DE 200 MG·HA ⁻¹).....	115
FIGURA 28 – CONTENIDO DE NONILFENOL Y ETOXILATO DE NONILFENOL EN TRIGO TRATADO CON BE100 (SUELO + BIOSÓLIDO EL TREBAL ENRIQUECIDO CON NP, EN DOSIS DE 100 MG·HA ⁻¹) Y BE200 (SUELO + BIOSÓLIDO EL TREBAL ENRIQUECIDO CON NP, EN DOSIS DE 200 MG·HA ⁻¹)	117
FIGURA 29 – BIODISPONIBILIDAD DE 4-NP EN PARTE AÉREA Y RAÍZ DE TRIGO ENCONTRADA PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS APLICADOS B100, B200, BE100 Y BE200.....	120
FIGURA 30 – CORRELACIÓN ENTRE MOVILIDAD Y ABSORCIÓN POR LAS PLANTAS DE TRIGO.....	121
FIGURA 31 – EFECTO DE DOSIS DE BIOSÓLIDO EN EL CRECIMIENTO DE PARTE AÉREA Y RAÍCES EN PLANTAS DE TRIGO.....	124

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente en Chile, existen planes del sector sanitario e industrial, que apuntan hacia el tratamiento de las aguas residuales, tanto de origen domiciliario, como de origen industrial. Es así, que la cobertura de tratamiento de aguas servidas muestra una tendencia creciente sostenida desde el año 2001, aumentando desde un 20,9% a un 81,9%. De acuerdo con esto, se espera un índice de cobertura de tratamiento de aguas servidas a nivel nacional del 100% (SISS, 2006).

Las aguas servidas domésticas contienen básicamente materia orgánica, nutrientes y microorganismos patógenos, que son necesario remover, antes de su descarga final. El tratamiento genera grandes cantidades de lodos sanitarios, cuya disposición, puede provocar problemas de orden ambiental.

Los biosólidos (o lodos estabilizados), provienen de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas y/o industriales, pero por sus características, o por las adquiridas después de un proceso de estabilización biológica, física o química, pueden ser reutilizados (INN, 2004a).

Existen variadas formas de disposición de los biosólidos, entre las que se encuentran: disposición en vertederos, la aplicación en suelos, aplicación como relleno, o su incineración. Es así, como en Estados Unidos, un 41% de los biosólidos producidos, sin compostaje o tratamiento adicional se aplica a suelos, a un 12% se le aplica un tratamiento avanzado, como compostaje, un 7% se usa en otros fines benéficos, un 22% se incinera, y un 17% se desecha o se usa como relleno. Por otra parte, la disposición en rellenos sanitarios, o su incineración, son

una alternativa económicamente más costosa que su utilización como enmienda en terrenos con fines agrícolas (USEPA, 1982; 1999). En nuestro país, para evitar un potencial problema de contaminación debido a la aplicación de estos residuos en suelos agrícolas y forestales específicamente en ámbito de contaminación por metales pesados, se elaboró el “Reglamento de Manejo de Lodos generados en Plantas de Tratamientos de Aguas” (INN, 2004b) que estuvo en consulta pública hasta que fue aprobado en enero del 2005 y finalmente realizadas algunas modificaciones, el documento fue publicado en enero de 2009 (Ministerio Secretaría General de la Presidencia, 2009). En este mismo plano, algunas investigaciones nacionales se han enfocado en la problemática de aplicación de biosólidos a nivel agrícola y forestal (Aguilera y Rodríguez, 2005; Ahumada y col., 2004; Ascar y col, 2007; Guerra y col, 2007).

Basándose en el principio de que “los residuos de una actividad pasen a constituirse en insumos de la siguiente”, es que los biosólidos producidos por las plantas de tratamiento de aguas servidas pueden servir como reemplazo parcial de los fertilizantes tradicionales, dado su alto contenido de materia orgánica, y dependiendo de la dosis de aplicación, es la cantidad de nutrientes que aportarán a los suelos (King y col., 1974).

Debido a que la materia orgánica presente en el lodo sirve como acondicionador de suelos, su aplicación puede mejorar la labranza y la textura del suelo. Los biosólidos contienen cantidades variables de macronutrientes como fósforo y nitrógeno, pequeñas cantidades de potasio, y variados micronutrientes, que en general están en menor concentración que en los fertilizantes comerciales. Sin embargo, la utilización de biosólidos reduce o elimina el uso de fertilizantes

comerciales, con lo cual se reduce el impacto de altos niveles de nutrientes en exceso, ingresen al medio ambiente (USEPA, 1982; 1999).

Los componentes del biosólido están determinados por el origen de las aguas servidas y su tipo de tratamiento. Entre sus componentes, el de mayor abundancia corresponde a materia orgánica, en relación a compuestos inorgánicos y a microorganismos. Los compuestos orgánicos encontrados en los biosólidos son el resultado de descargas industriales, comerciales y domiciliarias, pero también producto de contaminación atmosférica. El componente orgánico está constituido por compuestos tóxicos y no tóxicos. Los primeros se encuentran en menor cantidad, y son compuestos muy diversos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plaguicidas, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos (PCDD/F), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles y detergentes (Epstein, 2003; WEAO, 2001). Por su parte, el componente orgánico considerado como no tóxico contiene básicamente proteínas, aceites, grasas y ácidos orgánicos, los cuales proveen sitios activos para la sorción de los componentes orgánicos tóxicos.

Los detergentes de tipo no iónico, como los polietoxilatos de alquilfenol, son ampliamente usados desde 1940, en detergentes domésticos e industriales, agentes antiestáticos, emulsificantes para agroquímicos, antioxidantes para la manufactura de gomas, textiles, productos de cuidado personal, y aditivos de aceites lubricantes, son muy abundantes en biosólidos, del orden de 180 – 990 mg/kg (La Guardia y col., 2001). Estos etoxilatos de alquilfenoles y sus productos de degradación, los alquilfenoles, particularmente octilfenol y nonilfenol, son persistentes,

bioacumulables, y altamente tóxicos, con actividad potencialmente estrogénica (Peng y col., 2007; Sabik y col., 2003; USEPA, 2005).

La presencia de polietoxilatos de alquilfenol, y sus metabolitos, en lodos y en el medio ambiente, se debe a la actividad antropogénica, dado que no se conocen fuentes naturales de estos compuestos (Langford y col., 2005)

Las rutas de exposición del ser humano a los alquilfenoles, son diversas: por alimentos contaminados y agua potable, pero también por absorción dérmica después de la aplicación de productos que los contengan, o por la inhalación de éstos (IUPAC, 1998).

Estos xenobióticos son clasificados como disruptores endocrinos (EDCs), debido a que interfieren con las funciones endocrinas, causando alteraciones y modificaciones del desarrollo sexual y reproductivo en la fauna salvaje, y se ha reportado que pueden inducir varios efectos en el cuerpo humano, como bajo conteo de espermios, pubertad temprana, disfunciones tiroideas, crecimiento de células de cáncer mamario, entre otros (Gadzala-Kopciuch y col., 2007; Brown y col., 2009). Si bien su uso no ha sido regulado particularmente por la USEPA, ha sido prohibido por el gobierno de Suiza, desde 1986, y ciertas jurisdicciones europeas han fijado límites para la concentración en biosólidos aplicados a suelos. De esta forma, los límites propuestos por la Unión Europea, para los nonilfenoles y sus etoxilatos en lodos sanitarios, es de 50 mg/kg (sobre base seca) (Nuñez y col., 2007; WEAO, 2001). En nuestro país, dentro del proyecto de norma regulatoria de aplicación de lodos sanitarios, aún no se considera la inclusión de contaminantes orgánicos (INN, 2004b).

Los polietoxilatos de alquilfenol, tienen propiedades hidrofílicas, que los hacen más afines a estar presentes en efluentes y entrar al medioambiente acuático, en donde puede ocurrir su degradación (Langford y col., 2005)

Se ha encontrado, que los etoxilatos de alquilfenol reaccionan con el cloro durante el tratamiento del agua potable, formando nonilfenol durante esta etapa de pretratamiento (Richardson y Ternes, 2005). Bajo condiciones aeróbicas, los polietoxilatos de alquilfenol se degradan a través de la pérdida de unidades de óxido de etileno, para formar etoxilatos de bajo peso molecular, o a través de la formación de etoxilatos carboxilados, los cuales terminarán en CO₂ y agua. En condiciones anaeróbicas, se produce el alquilfenol, por ruptura de los polietoxilatos de alquilfenol (Figura 1). De esta forma, los lodos estabilizados poseen una concentración entre 4 y 8 veces superior que los lodos crudos o sin estabilización (Gibson y col., 2007; Nuñez y col., 2007; USEPA, 2005)

Los alquilfenoles pueden ser sorbidos fuertemente en la materia orgánica de los biosólidos, y dado que no son la única fuente de carbono disponible, los microorganismos no los degradarían preferentemente (Xia y Yoon Jeong, 2004). Su mecanismo de sorción es simple, ya que el compuesto sólo es deprotonado cuando el pH excede el pKa (pH>10). Consecuentemente, bajo la mayoría de las condiciones medioambientales, la molécula no tiene carga eléctrica y por lo tanto, su interacción es por adsorción hidrofóbica en la fracción orgánica. Sin embargo, se ha demostrado que en los procesos de sorción participarían también puentes de hidrógeno (Jacobsen y col., 2004).

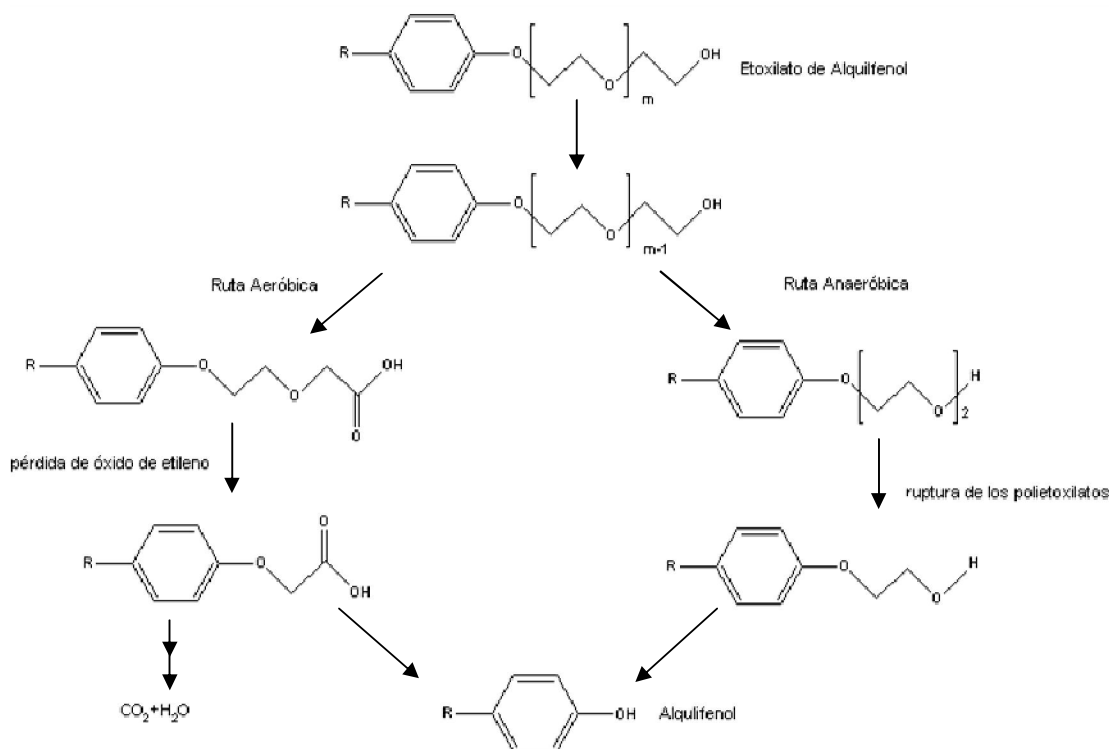


Figura 1 – Ruta de degradación de los etoxilatos de alquilfenol

Los procesos de sorción de estos contaminantes orgánicos hidrofóbicos, pueden ser considerados como un tipo de *proceso de partición*, ya que involucra la distribución de los contaminantes orgánicos entre la fase acuosa y la fase sólida no polar del biosólido (Ehlers y Loibner, 2006).

Por otra parte, estos compuestos pueden sufrir *secuestro* luego de largos tiempos de residencia, o envejecimiento. Un contaminante se considera secuestrado cuando la velocidad de desorción es muy lenta, lo que se refleja por la transferencia de masa del compuesto (Gevao y col., 2000). La sorción y el secuestro pueden ser vistos como un solo proceso, el cual es inicialmente rápido y que luego cambia a una velocidad menor y sostenida (Huang y col., 1996; Pignatello y Xing, 1996), lo

cual no implica que la etapa lenta (secuestro), sea dependiente de la etapa rápida (sorción). Aunque el secuestro es una forma de sorción, no hay una barrera física o química que prevenga que los dos procesos ocurran simultáneamente y tengan cursos de tiempo independientes (Dec y Bollag, 1997).

Estos compuestos pueden ser retenidos en la matriz a través de fuerzas de enlace de naturaleza variable. Aquellas interacciones adsorbente-adsorbato débiles estarían gobernadas por las fuerzas de Van der Waals de corto rango o también por aquellas inducidas por dipolos, y que decaen rápidamente con la distancia (Gevao y col., 2000). De esta forma, el transporte, enlace y desorción de estos contaminantes orgánicos hidrofóbicos, depende de la naturaleza, morfología, y de las propiedades macro y microscópicas de la matriz sólida. Los factores medioambientales, como la temperatura, el pH, y el contenido de humedad, juegan un papel importante en conjunto con las propiedades fisicoquímicas, estructura molecular y concentración de los contaminantes (Pignatello y Xing, 1996).

Asimismo, los mecanismos de remoción de estos detergentes, y de sus productos de degradación, están controlados por la degradación, en el caso de los etoxilatos de nonilfenol, dado que presentan un bajo valor de $\log K_{ow}$ ($\approx 4,2$), mientras que en los nonilfenoles, la sorción en el floculo orgánico sería un mecanismo de remoción importante, debido a su alto valor de $\log K_{ow}$. Se ha demostrado que el grado de remoción de un compuesto depende de sus propiedades fisicoquímicas, que están determinadas por su solubilidad en agua, coeficiente de partición carbono orgánico/agua (K_{oc}), coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), y su constante de ley de Henry (H_c) (Langford y col., 2005), por lo tanto, su remoción estaría asociada a los distintos tipos de carbono orgánico presente en los biosólidos.

Los alquilfenoles pueden ser determinados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC–MS), cromatografía líquida (LC), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC–MS). Entre ellas, GC–MS es usada generalmente para la determinación de alquilfenoles en muestras medioambientales, debido a su alta habilidad de separación y bajos límites de detección. Debido a que los alquilfenoles son compuestos polares, su análisis por GC–MS se puede desarrollar, después de la extracción, por derivatización como acilación, alquilación, sililación, entre otras (Kojima y col., 2003).

El procedimiento analítico típico incluye varios pasos de preparación de muestra, como filtración, extracción, purificación y evaporación, e hidrólisis y derivatización para su posterior análisis (Lopez de Alda y col., 2003). Los procedimientos de extracción clásicos consumen grandes cantidades de disolventes, con los consiguientes riesgos medioambientales y ocupacionales, además de ser poco selectivos (Pawliszyn, 2003).

El proceso de extracción de compuestos orgánicos desde matrices sólidas es el ejemplo más general de extracción debido a que involucra varios procesos fundamentales que ocurren dentro del proceso de extracción. Si asumimos que una partícula de matriz corresponde a una capa orgánica, en un núcleo impermeable, pero poroso, y que el analito es adsorbido en la superficie del poro, el proceso de extracción puede ser modelado considerando varias etapas básicas. Para remover el analito desde este contenedor, el compuesto debe ser primero desorbido desde su superficie; luego debe difundir a través de la parte orgánica de la matriz, para llegar a la interface matriz/fluido. En este punto, el analito debe ser solvatado por la fase de extracción, y debe luego difundir a través de la fase estática presente dentro

del poro, para llegar a la porción de la fase de extracción que es afectada por convección. El analito es luego transportado a través de los poros intersticiales de la matriz, hasta llegar a la fase de extracción (Pawliszyn, 2003).

La determinación de contaminantes orgánicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos en matrices sólidas, a menudo presenta extensas y complejas operaciones de preparación de muestra, principalmente debido a la dificultad de lixiviación cuantitativa del analito desde la muestra sólida. Debido a que en algunas ocasiones, las interacciones entre analitos y matriz sólida son muy fuertes, las metodologías tradicionales basadas en extracción Soxhlet no proveen suficiente energía para liberar los analitos rápidamente, y además requieren largos tiempos de extracción (8 – 48 h) (Richter et al., 2006).

Varios métodos modernos de extracción, alternativos al Soxhlet, han sido propuestos, como la extracción por agitación ultrasónica (USE), extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con disolventes acelerada (ASE) y extracción asistida por microondas (MAE o MASE), entre otras, que han demostrado tener recuperaciones similares o incluso mejores que la extracción Soxhlet (Camel, 2001). Estas metodologías tienen grandes ventajas comparativas con respecto a la extracción Soxhlet, como la rapidez en completar la extracción, y la menor cantidad necesaria de disolventes extractantes y de muestra.

Respecto de la extracción con disolventes acelerada (ASE), también conocida como extracción con fluidos presurizados (PFE), que constituye una metodología que ya dispone de sistemas comerciales, e incluso ha sido reconocida oficialmente por la USEPA, si bien constituye una metodología que presenta ventajas respecto a la extracción Soxhlet, como las mencionadas anteriormente, podría ser mejorada

sustancialmente, ya que la extracción se produce en forma discontinua. Una metodología relativamente nueva, que tiene las ventajas de ésta técnica, es la extracción con disolventes presurizados (PSE), en la que el proceso de extracción se produce en forma continua, lo que implica que la muestra siempre está en contacto con disolvente fresco, por lo que se produce un gradiente de concentración, que facilita el proceso de extracción sólido – líquido. Por otra parte, es un sistema que permite acoplar otros tipos de extracción, como ultrasonido, constituyéndose en una técnica bastante dinámica y flexible.

Es necesario poder optimizar las variables que afectan la extracción de los analitos de la matriz en estudio, para que la metodología de separación, en conjunto con las de cuantificación, sean eficaces, y constituyan un método cuantitativo de determinación de los analitos.

Una vez concluido el desarrollo y puesta en marcha de este sistema de extracción, su aplicación será factible en estudios que: (1) determinen la movilidad de estos contaminantes a través del suelo, y (2) que permitan correlacionar las características propias de la matriz, con la extractabilidad de estos contaminantes.

II. HIPÓTESIS

- II.1. El uso de disolventes orgánicos en condiciones enérgicas de presión y temperatura, mejorarían la eficiencia de extracción (en términos de recuperación y rapidez) de los alquilfenoles desde biosólidos, respecto de un sistema de extracción Soxhlet convencional.
- II.2. La materia orgánica aportada por la aplicación de biosólido a los suelos, disminuirá la biodisponibilidad de los etoxilatos de alquilfenol y sus metabolitos.

III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología de extracción con disolvente presurizado de derivados de alquilfenoles en biosólidos y suelos, y aplicarla en estudios de degradación y movilidad de estos contaminantes en suelos.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- III.2.1. Implementar un método cromatográfico para la separación de etoxilatos de nonilfenol y octilfenol y sus derivados, los nonilfenoles y octilfenoles, a través de GC-MS.
- III.2.2. Optimizar las variables para la extracción de etoxilatos de nonilfenol y octilfenol, y sus derivados, los nonilfenoles y octilfenoles, desde biosólido, a través de un sistema de extracción por disolvente presurizado en continuo.
- III.2.3. Optimizar las variables para la extracción de etoxilatos de nonilfenol y octilfenol, y sus derivados, los nonilfenoles y octilfenoles, desde suelos enmendados con biosólidos, a través de un sistema de extracción por disolvente presurizado en continuo.
- III.2.4. Validar la metodología. Determinar la eficiencia de extracción en cada caso, en términos de recuperación y tiempo de extracción. Determinación de las propiedades analíticas de cada alternativa.

- III.2.5. Implementación de la metodología de extracción ASE (versión comercial) y Soxhlet, como métodos comparativos.
- III.2.6. Aplicar la metodología en estudios de movilidad de los contaminantes en un suelo agrícola típico de la zona central de Chile, enmendado con biosólidos.
- III.2.7. Analizar e interpretar los resultados de los dos objetivos precedentes a través de estudios de correlación multivariados entre las concentraciones obtenidas y las características de cada una de las matrices analizadas (dosis de enmienda, tiempo, profundidad).
- III.2.8. Determinar la absorción de estos compuestos a través de cultivos de trigo en suelos controles y tratados con distintas dosis de biosólidos, a través de metodologías de extracción con disolventes presurizados.
- III.2.9. Determinar la fracción biodisponible de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en muestras de biosólidos y suelo utilizando metodologías de extracción con disolventes presurizados, y plantas de trigo para su validación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. MATERIALES Y REACTIVOS

IV.1.1. Estándares

Se utilizaron estándares de 4-Octilfenol Etoxilato (4-OPE), 4-Nonilfenol Etoxilato (4-NPE), 4-n-Octilfenol (4-n-OP) y 4-Nonilfenol (4-NP), adquiridos en Dr. Ehrenstorfer (Alemania), siendo de grado técnico (mezclas de isómeros) 4-OPE, 4-NP y 4-NPE, mientras que 4-n-OP, tiene una pureza del 99,0%. Además, se utilizó 4-t-Octilfenol, de 99,4% de pureza, adquirido en Supelco (USA). Estos estándares fueron disueltos en metanol, para la confección de las curvas de calibración.

Como estándar interno, en la determinación por GC-MSD, se utilizó tribromo anisol (TBA), disuelto en ciclohexano.

IV.1.2. Disolventes

Acetato de etilo, acetonitrilo, acetona, ácido fórmico, ciclohexano, diclorometano, éter dietílico, metanol y tolueno, fueron adquiridos en Merck, siendo de grado cromatográfico. Hexano fue adquirido en Fischer Scientific, siendo n-Hexano de 95%, y el resto una mezcla de isómeros, de grado cromatográfico.

IV.1.3. Adsorbentes, desecantes y soportes

Óxido de aluminio 90, neutro, de actividad I, fue activado por 8 h a 105°C. Sulfato de sodio (Na₂SO₄) fue activado por 4 h a 400°C. Ambos reactivos son de grado cromatográfico y fueron adquiridos en Merck.

Como soporte de las columnas se utilizó lana de vidrio silanizada, de Chromatography Research Supplies, Inc.

IV.1.4. Material de vidrio

Todo el material de vidrio, tanto volumétrico, como viales y frascos de recepción, columnas de secado y de limpieza de extractos, fueron lavados con alcalino libre de etoxilatos de alquilfenol (Extran), adquirido en Merck, HNO₃ 10% v/v, y agua destilada.

IV.1.5. Semillas

Trigo (*Triticum Aestivum*)

IV.2. METODOLOGÍA ANALÍTICA

IV.2.1. Elección de los analitos

Para el estudio de optimización del proceso de extracción con disolventes presurizados, se seleccionaron los siguientes analitos: 4-Octilfenol Etoxilato (4-OPE), 4-Nonilfenol Etoxilato (4-NPE), 4-n-Octilfenol (4-n-OP), 4-t-Octilfenol (4-t-OP) y 4-Nonilfenol (4-NP). La elección de este grupo de analitos obedece a

que estos etoxilatos, constituyen un grupo de compuestos de amplia utilización en productos de limpieza y cuidado personal, y son precursores de estos alquilfenoles, los cuales poseen actividad disruptora endocrina (Peng y col., 2007; Sabik y col., 2003; USEPA, 2005).

IV.2.2. Método cromatográfico

En primera instancia, se optimizó un método cromatográfico utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

La optimización del método cromatográfico se llevo a cabo en un HPLC HP 1050, con autosampler, utilizando una columna Phenomenex, Luna, C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ), a una λ de 280,4 nm, con una fase móvil acetoneitrilo/agua (60:40), un flujo de 0,7 mL/min, un volumen de inyección de 100 μ L, una velocidad de inyección de 200 μ L/min. La presión de trabajo se mantuvo alrededor de las 500 psi.

Posteriormente, se optimizó un método cromatográfico utilizando un cromatógrafo de gases con un detector de masas (GC-MSD), utilizando un cromatógrafo Agilent 6890 Plus acoplado a un detector de masas Agilent 5973N, provisto de una columna HP5 (30 m x 0,25 mm). Como gas carrier se utilizó Helio. El modo de inyección fue en modalidad Splitless, con un volumen de inyección de 1 μ L. El programa de temperaturas fue el siguiente: Temperatura inicial de 100°C, por un minuto, con una rampa de 10°C/min, llegando a una temperatura final de 280°C, por 3 minutos.

IV.2.3. Límites de detección y cuantificación

Se determinaron los límites de detección y cuantificación (Baez y Zincker, 1999), realizando una curva de calibración de cada compuesto, midiendo las respuestas de cada analito dentro de la mezcla, y del estándar interno utilizado. Se utilizaron 9 niveles de concentración, en concentraciones entre 5,0 – 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se calculó la ecuación:

$$R = a + bC$$

Donde **R**: Relación de áreas Analito/Estándar Interno

a: Ordenada en el origen

b: Pendiente

C: Concentración

De esta forma, se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LC):

$$LD = 3 \cdot \left(\frac{S_{R/C}}{b} \right) \cdot \left(\frac{n-2}{n-1} \right)^{1/2}$$

$$LC = 10 \cdot \left(\frac{S_{R/C}}{b} \right) \cdot \left(\frac{n-2}{n-1} \right)^{1/2}$$

Donde **S_{R/C}**: Desviación estándar de la regresión

n: Número total de pares de datos para el cálculo de la regresión

IV.2.4. Metodología de secado y limpieza de extractos

Los extractos fueron secados en una columna de vidrio con 10 cm de Na_2SO_4 (USEPA, 1996). Posteriormente fueron concentrados a 1 mL en una corriente de N_2 , para ser sometidos al proceso de limpieza de extractos.

Para el análisis cromatográfico cuantitativo, la limpieza se llevó a cabo en columnas de vidrio de 8 cm x 1 cm de DI, montadas sobre un sistema de vacío manifold (Visiprep, Supelco), rellenas con 5 g óxido de aluminio. Las columnas fueron acondicionadas con 10 mL de una mezcla de acetato de etilo/tolueno (3:1 v/v), posteriormente, el extracto fue con 30 mL de la misma mezcla de disolventes, los cuales fueron colectados y descartados, constituyendo la fracción I. Posteriormente, se eluyeron 20 mL de una mezcla de éter dietílico/metanol/ácido fórmico (1:1:0,05 v/v), constituyendo la fracción II, que fue colectada en viales de vidrio de 40 mL (Meesters, 2002), se les cambió el disolvente a metanol, y fueron concentrados, utilizando una corriente de N_2 . Antes de llegar al volumen deseado, se les inyectó un microvolumen de estándar interno.

IV.2.5. Obtención y caracterización de los lodos

Se hizo un muestreo de dos lodos sanitarios provenientes de dos Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas de la región Metropolitana. Las muestras corresponden a lodos dispuestos en Enero de 2008 en el monorrelleno de cada una de las plantas.

Los lodos fueron secados al aire, molidos y tamizados a 2 mm, y se determinó su porcentaje de humedad (Sadzawka y col., 2006), para corregir las

determinaciones sobre base seca. Se procedió a conservarlos a baja temperatura (-18°C), para evitar la degradación de los analitos.

IV.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

IV.3.1. Lodos Sanitarios

Los lodos sanitarios constituyen una matriz en la que se encuentran nativamente los alquilfenoles y eventualmente sus etoxilatos.

En primera instancia, se determinaron los contenidos totales de los analitos en ambos lodos, según las recomendaciones de Meesters, ya que no existe una metodología estándar de extracción de estos analitos desde esta matriz en particular.

IV.3.1.1. Extracción Soxhlet

Se realizó una extracción Soxhlet, para determinar la presencia de los analitos de interés en dicha matriz, utilizando 2 g de lodo seco, 2 g de Na₂SO₄, como dispersante, y 250 mL de una mezcla diclorometano:metanol (2:1 v/v), en 4–6 ciclos/h, por 24 horas (USEPA, 1996; Meesters, 2002). Posteriormente, los extractos obtenidos se secaron en una columna de vidrio rellena con 10 cm de Na₂SO₄, colectándose en matraces de vidrio ámbar adecuados, reduciendo el volumen a 1 mL y sometidos a limpieza de extractos.

Para la optimización del método de determinación los analitos se eligió la muestra de lodo que presentaba el más alto contenido de etoxilatos de alquilfenol y alquilfenoles, la que fue conservada a -18°C, en un envase de polietileno sellado herméticamente.

IV.4. METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN

IV.4.1. Estudios de extractabilidad

Se utilizaron porciones de 0,5 g de lodo, por duplicado, en viales de vidrio de 40 mL.

Los disolventes seleccionados fueron acetona (Acet), diclorometano (DCM), hexano (Hex) y metanol (MetOH), y sus mezclas 1:1 v/v, DCM/Acet, DCM/MetOH, Hex/Acet, Hex/MetOH). Se utilizó un volumen de 10 mL de cada mezcla, y se realizó la extracción en un baño de ultrasonido Transsonic T310, operando a una frecuencia de 35 kHz, a temperatura ambiente, con los viales cerrados herméticamente para evitar la volatilización de los disolventes.

Posteriormente, los extractos fueron secados, concentrados a 1 mL y sometidos a limpieza, cambio de disolvente y concentración.

IV.4.2. Extracción con disolventes presurizados en batch (ASE® 100)

Una vez determinado el tipo el disolvente o de mezcla más adecuada para la extracción cuantitativa de los analitos en estudio, se procedieron a fijar las condiciones de trabajo según los límites del extractor con disolventes

presurizados. En cada extracción se utilizó una cantidad de 0,5 g de lodo seco y tamizado. La optimización fue comparada con la extracción Soxhlet, en las mismas condiciones de disolvente, pero utilizando una cantidad de 2 g de lodo seco y tamizado.

IV.4.3. Extracción con disolventes presurizados en modo híbrido

Se implementó la metodología de extracción con líquidos presurizados en continuo haciendo uso de la configuración de extracción en modo híbrido (continuo–discontinuo), construida por nuestro grupo de investigación, donde se llevaron a cabo los estudios (Figura 2).

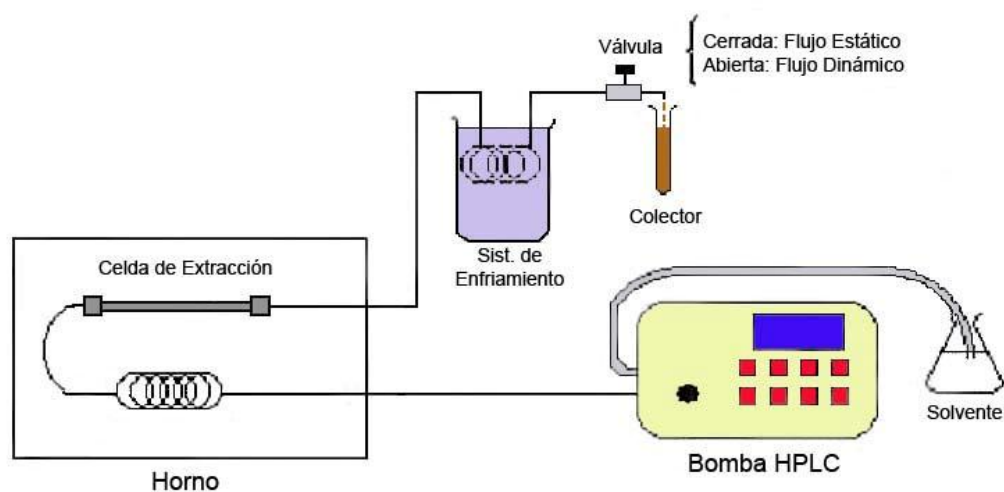


Figura 2 – Extractor que opera de manera híbrida (continua–discontinua).

La configuración del sistema de extracción cuenta con los siguientes componentes: una bomba de HPLC, marca Perkin Elmer, series 200 LC Pump, que es capaz de mantener un flujo de disolvente constante, con indicador de

presión del sistema, que soporta una presión de 6000 psi; un horno de aluminio, provisto de un controlador de temperatura (opcionalmente, este horno puede ser reemplazado por un baño de ultrasonido); un tubo de acero inoxidable (1/16" d.i.) enrollado, de 3 m para mantener el disolvente de entrada a la temperatura en que se realizará la extracción; una celda de acero inoxidable, que consiste en una columna de HPLC en desuso y ahuecada (20 x 0,4 cm), que contiene a la muestra y donde ocurre el proceso de extracción sólido – líquido; un tubo de acero inoxidable enrollado de 1 m (1/16" d.i.) ubicado fuera del horno de aluminio, sumergido en agua, para enfriar los extractos; una válvula, que ayuda a controlar el flujo de salida del extracto y la presión del sistema; y un vial colector del extracto, para posterior limpieza del mismo.

La selección de la modalidad, depende de la posición de la válvula. Si la válvula está cerrada, y el sistema sólo es presurizado por la bomba de HPLC, sin mantener un flujo en el tiempo, estamos en presencia de extracción con disolvente presurizado estática, análoga a la que se realiza en ASE. Si por el contrario, la válvula se encuentra abierta, mientras la bomba alimenta de disolvente el sistema, estamos en presencia de extracción con disolventes presurizados, en modalidad continua.

Para los experimentos referentes al análisis y optimización estadísticos, se utilizó 0,3 g de material de referencia.

IV.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

La aplicación del método de extracción se llevó a cabo, con el objetivo de estudiar la influencia de la aplicación de biosólido en la movilidad y biodisponibilidad de alquilfenoles

IV.5.1 Preparación de las muestras

En ambos estudios, para la preparación de las mezclas suelo-biosólido según la dosis de aplicación de biosólido, fue necesario determinar los siguientes parámetros: densidad aparente, humedad del biosólido, y humedad del suelo a capacidad de campo.

Densidad aparente de los suelos: En una probeta de 100 mL, se pesó una cierta cantidad de muestra, se dio un par de golpes contra el mesón, y se midió el volumen resultante. Los resultados fueron expresados en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$.

Humedad del biosólido: Se determinó gravimétricamente a 105°C (Sadzawka y col., 2006).

Determinación de la cantidad de biosólido según la dosis de aplicación: Una vez determinada la humedad, se calcula la cantidad de biosólido sobre base húmeda a utilizar, en función de la dosis de aplicación en el suelo (100 o 200 $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$):

$$B = \frac{bh \cdot DB}{bs}$$

B: Masa de biosólido húmedo a utilizar, en función de la dosis de biosólido a aplicar como enmienda [kg]

bh: Masa de biosólido húmedo sobre la cual se determinó humedad [kg]

bs: Masa de biosólido sobre base seca [kg]

DB: Dosis de biosólido a utilizar en la enmienda i.e. 100 Mg= 100000 kg

Humedad del suelo a capacidad de campo: Se pesa una cierta cantidad de suelo (ms), en un vaso precipitado tarado previamente, y se agrega agua destilada, con una piseta, incorporándola al suelo con una varilla de vidrio, hasta conseguir una pasta húmeda, sin escurrimiento de agua visible. La cantidad de agua total agregada al suelo (ma), se obtiene por la diferencia entre la masa del suelo original, y la masa del suelo en condiciones de saturación.

Determinación de la masa de suelo por hectárea de terreno: Se puede calcular la masa de suelo existente en una hectárea, considerando su superficie (1 ha=10000 m²) y la profundidad de la extracción de las muestras (20 cm=0,2 m). Luego,

$$MS = 10000 \cdot 0,2 \cdot DA$$

MS: Masa de suelo por superficie de terreno [kg·ha⁻¹]

DA: Densidad aparente [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]

Determinación de la masa de biosólido a utilizar, según la dosis a aplicar como enmienda: Se considera que la masa de biosólido húmedo a utilizar será aplicada a una determinada superficie de terreno, por lo que es expresada en unidades de masa por superficie, [$\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$]. Por otra parte, se considera la masa del suelo a enmendar, y la masa de suelo por superficie de terreno. De esta forma,

$$MB = \frac{B \cdot MF}{MS}$$

MB: Masa de biosólido húmedo a utilizar en la enmienda [kg]

B: Masa de biosólido húmedo a utilizar, en función de la dosis de biosólido a aplicar como enmienda [$\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$]

MF: Masa de suelo a utilizar para el fraccionamiento [kg]

MS: Masa de suelo por superficie de terreno [$\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$]

Determinación de la cantidad de agua necesaria para que el suelo en incubación alcance las condiciones de capacidad de campo: La capacidad de campo corresponde al porcentaje de agua que un suelo es capaz de retener luego de haber sido saturado con ella y drenado por efecto de la tensión del suelo seco que se encuentra debajo de él.

Se considera la masa de suelo a enmendar, la masa de suelo utilizada para determinar la humedad en condiciones de capacidad de campo, y la cantidad de agua necesaria para que el suelo alcance dicha humedad. Así,

$$A = \frac{MF \cdot ma}{ms}$$

A: Masa de agua para que el suelo en incubación alcance las condiciones de capacidad de campo [g]

MF: Masa de suelo a utilizar para el fraccionamiento [g]

ma: Masa de agua utilizada para determinar la capacidad de campo en los suelos [g]

ms: Masa de suelo utilizada en la determinación de la capacidad de campo [g]

Por otra parte, con el objetivo de obtener un biosólido con alto contenido de 4-NP, se enriqueció una cantidad de biosólido BET2008 con NP de grado técnico. Para esto se utilizó como disolvente acetona grado HPLC, en la cual se disolvieron completamente 1506 mg de NP, solución que luego se adicionó a 1,002 kg de biosólido. La solución se homogeneizó utilizando un agitador mecánico hasta la evaporación total del disolvente. De esta forma se obtuvo dos biosólidos distintos dependiendo de su contenido de NP: biosólido sin enriquecer (B) y biosólido enriquecido (BE).

IV.5.2. Estudio de movilidad

Se estudió la movilidad de los contaminantes en el suelo, para lo cual se utilizaron columnas de vidrio de 25 x 3 cm, provistas de una llave de teflón en su parte inferior. Para evitar el escurrimiento de material sólido desde las columnas, en la parte inferior se rellenaron con lana de vidrio silanizada y una capa de cuarzo, finamente dividido.

Se utilizó un suelo agrícola de la Región Metropolitana, de la Serie Chada (CHD), ubicada al sur de la ciudad de Santiago. Las muestras fueron obtenidas del nivel superficial (0 a 20 cm de profundidad). Las muestras recolectadas fueron secadas al aire, disgregadas y tamizadas, utilizando un tamiz plástico de 2 mm de abertura, y luego almacenadas en frascos de polietileno de alta densidad, a temperatura ambiente.

Las columnas fueron empacadas con 300 g de suelo, aproximadamente. En la parte superior de cada columna se agregaron cantidades equivalentes a 100 y 200 Mg·ha⁻¹, de biosólido enriquecido con una alta concentración de 4-Nonilfenol. Además, se empacaron columnas con suelo y biosólido sin enriquecer con NP en proporción de 100 Mg·ha⁻¹, a modo de testigo.

Las columnas fueron envueltas en papel de aluminio, para evitar su exposición a la luz, y mantenidas en condiciones de capacidad de campo, con agua Milli-Q. El lixiviado de cada columna fue colectado en matraces ámbar, y filtrado al vacío, y posteriormente se sometieron a extracción líquido – líquido, con hexano, por agitación energética en embudo de decantación, por 1 min (Brown y col., 2009). Estos extractos fueron secados en columnas de Na₂SO₄, a continuación fueron concentrados, y por último sometidos a limpieza.

De esta forma, el ensayo estuvo compuesto por 12 columnas: 4 columnas empacadas con suelo y biosólido en dosis $100 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ sin enriquecer, 4 columnas rellenas con suelo y biosólido enriquecido en una proporción de $100 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, y 4 columnas rellenas con suelo y biosólido enriquecido en una proporción de $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Cada 15 días, se tomaron 3 columnas con distinto nivel de enmienda, y se seccionaron, en fracciones de 4 cm, obteniéndose un total de 5 fracciones por columna: fracción 1 (0–4 cm), fracción 2 (4–8 cm), fracción 3 (8–12 cm), fracción 4 (12–16 cm) y fracción 5 (16–20 cm), que fueron congeladas a $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar la descomposición de los compuestos, hasta su extracción.

Una vez establecido el ensayo en columnas, y recolectadas las fracciones correspondientes, se extrajeron en duplicado las fracciones 1, 3 y 5.

Se utilizó la siguiente codificación:

- a) Tiempo de duración del ensayo: 15 días: 15D; 30 días: 30D; 45 días: 45D; 60 días: 60D
- b) Enmienda utilizada: Biosólido: B; Biosólido enriquecido: BE
- c) Cantidad equivalente de enmienda aplicada: $100 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$: 100; $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$: 200
- d) Profundidad de extracción: fracción 1: F1; fracción 3: F3; fracción 5: F5

De esta forma, para la muestra 15DB100F1, fue una muestra recolectada a los 15 días, se utilizó biosólido sin enriquecer, en una dosis de $100 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, y se extrajo la fracción 1 (0–4 cm de profundidad).

IV.5.3. Biodisponibilidad de etoxilato de nonilfenol y nonilfenol a través de ensayos de invernadero con plantas de trigo (*Triticum aestivum*).

El biosólido y el suelo fueron secados al aire, molidos y luego tamizados a un tamaño de 2 mm. Se determinó su porcentaje de humedad para luego realizar las correcciones correspondientes sobre base seca. Además se determinaron diversos parámetros para caracterizar las propiedades fisicoquímicas del biosólido y el suelo. Para ambas matrices se determinó materia orgánica (%MO), carbono orgánico oxidable (%C), pH-H₂O (1:2,5), nitrógeno total, fósforo total, potasio total, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica, y además, se determinó la textura del suelo (Sadzawka y col., 2006). Los biosólidos fueron conservados a -18°C para evitar la degradación de los analitos.

Se realizaron dos ensayos con cultivo de trigo en el laboratorio utilizando dos dosis de biosólido (B) en cada uno, 100 Mg·ha⁻¹ (B100) y 200 Mg·ha⁻¹ (B200). En el primer ensayo se utilizó biosólido sin enriquecer y en el segundo se utilizó el biosólido enriquecido (BE) con 4-NP. Se utilizó suelo Chada (S) y semillas de trigo (*triticum aestivum*). Se realizó cada tratamiento en duplicado, incluyendo los correspondientes controles sin biosólido.

Se mezcló y homogeneizó suelo con la cantidad correspondiente de biosólido para cada tratamiento permitiendo un periodo inicial de estabilización de una semana. Luego de esta etapa se sembraron 100 semillas de trigo en 200 g. de suelo con biosólido según la dosis que correspondiera a cada tratamiento.

Todos los tratamientos se mantuvieron durante 35 días para permitir un crecimiento adecuado de las plantas, tiempo durante el cual se les aplicó

artificialmente un fotoperíodo de 8 h al día y se mantuvo en todos los tratamientos las condiciones de humedad adecuadas a capacidad de campo.

Al cabo de los 35 días, se dio por terminado el periodo de cultivo y en todos los tratamientos, las plantas fueron separadas en parte aérea y raíz. Ambas partes fueron lavadas con agua destilada para eliminar los restos de suelo y lodo, y fueron congeladas a 4°C antes de ser liofilizadas (liofilizador L101, Liobras), proceso que se lleva a cabo en 72 horas. Para esto fue necesario congelar las muestras a -80°C, antes de ser incorporadas al liofilizador. Durante la liofilización las muestras permanecen a -40 °C y a una presión de 500 mm Hg. Una vez obtenidas las muestras secas, con el objetivo de obtener una mayor superficie de contacto entre los tejidos vegetales y el disolvente de extracción, las plantas fueron molidas y homogenizadas utilizando un molinillo eléctrico.

Para el proceso de extracción se utilizó una metodología de extracción con disolventes presurizados en batch (Brown y col., 2008), optimizada para material vegetal, en un equipo ASE 100®. Se utilizó como disolvente de extracción una mezcla de diclorometano/acetona (80/20 v/v), una presión de extracción de 1650 ± 50 psi y una temperatura de 100 °C, en dos ciclos de extracción consecutivos de 60 min cada uno. La celda de extracción de 10 mL, fue cargada con un filtro de celulosa en el fondo, 0,25 g de muestra vegetal y una masa equivalente de tierra de diatomeas como dispersante. Terminado el proceso de extracción se realizó un procedimiento de limpieza de los extractos, previa a la inyección en el cromatógrafo, utilizando el mismo sistema de vacío mencionado anteriormente. Para esto, se rellenó la columna con 2,5 g de óxido de aluminio activado al fondo de la columna y 3,5 g de sulfato de sodio activado

sobre éste. Luego se acondicionó con 15 mL de hexano que fueron descartados y se adicionó el extracto a la columna que fue eluido con 30 mL de una mezcla diclorometano/acetona (1:1 v/v), que fue colectado en viales ámbar (Brown y col., 2008).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Implementación del método cromatográfico

V.1.1. HPLC–DAD

En primera instancia, se trabajó en un sistema HPLC–DAD. Se inyectaron estándares de los analitos en estudio, disueltos en metanol, de concentraciones de 10 mg/L, para determinar los tiempos de retención de cada uno (Tabla 1):

Tabla 1 – Tiempos de retención de los analitos estudiados (HPLC–DAD)

Analito	Tiempo de Retención [min]
Metanol (Blanco)	2,593
4-OPE	4,088
4-NPE	4,83
4-n-OP	4,831
4-t-OP	4,028
4-NP	4,723

Se observan dos grupos de coelución, en los intervalos 4,028 – 4,088 min. y 4,723 – 4,831 min., para los analitos 4-t-OP y 4-OPE, y para 4-NP, 4-NPE y 4-n-OP, respectivamente, lo que queda más claro al observar los cromatogramas obtenidos (Figura 3).

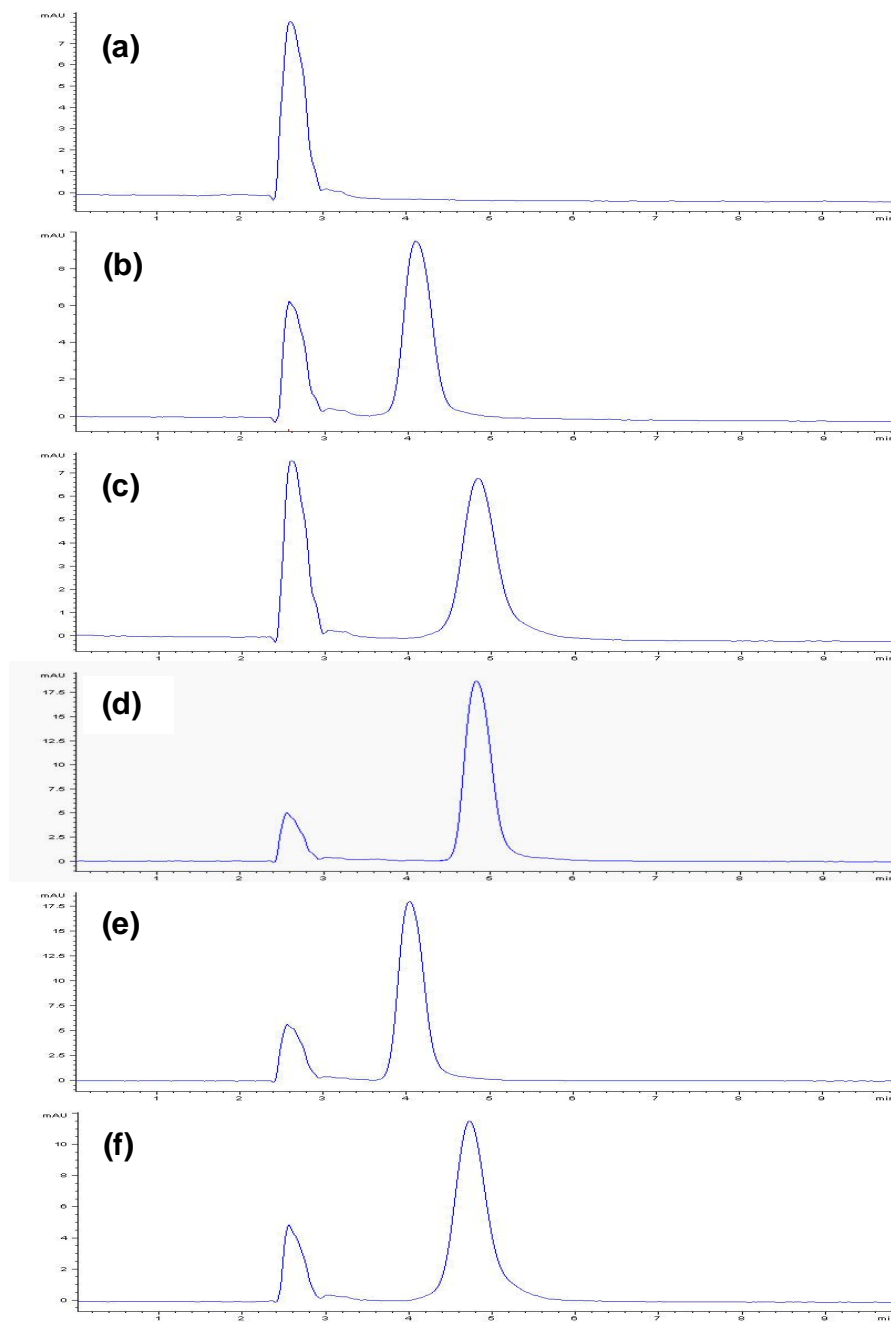


Figura 3 – Cromatogramas: (a) MetOH; (b) 4-OPE; (c) 4-NPE; (d) 4-n-OP; (e) 4-t-OP; (f) 4-NP

En la Figura 4, se puede observar un cromatograma compuesto por el frente de disolvente y por 2 picos cromatográficos, correspondientes a la inyección de una mezcla de estándares, que comprende a todos los analitos en estudio:

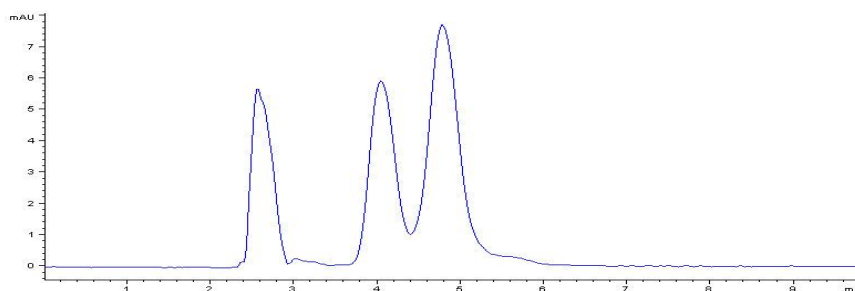


Figura 4 – Cromatograma de mezcla de estándares

Debido a las limitaciones propias del sistema HPLC-DAD, es que la determinación solo puede llevarse a cabo considerando que el área de cada pico cromatográfico es la sumatoria de los analitos que coeluyen, en este caso, para el primer pico a los 4,04 min, correspondería a 4-OPE y 4-t-OP, mientras que el pico cromatográfico en 4,79 min, corresponde a 4-NPE, 4-n-OP y 4-NP. Por este motivo, se gestionó la utilización de un sistema GC-MS, que permite la separación y determinación adecuada de estos compuestos.

V.1.2. GC-MSD

Se inyectaron estándares de los analitos en estudio, disueltos en metanol, en concentraciones de 75 mg/L, para determinar los iones principales y de confirmación de cada analito, y sus tiempos de retención obteniéndose los espectros de masas (Figura 5) y cromatograma correspondientes (Figura 6). De esta forma, la información recabada sobre estos estándares, puede resumirse en la Tabla 2:

Tabla 2 – Tiempos de retención, iones principales y de confirmación de los analitos estudiados (GC-MS)

Analito	Tiempo de Retención [min]	Ion Principal [m/z]	iones de confirmación [m/z]
4-t-OP	8,5	135	107/136
TBA	8,7	346	329
4-NP	9,48 – 10,17	135	107/121
4-n-OP	10,23	107	206/108
4-OPE	11,25	179	135/107
4-NPE	12,04 – 12,98	179	135/107

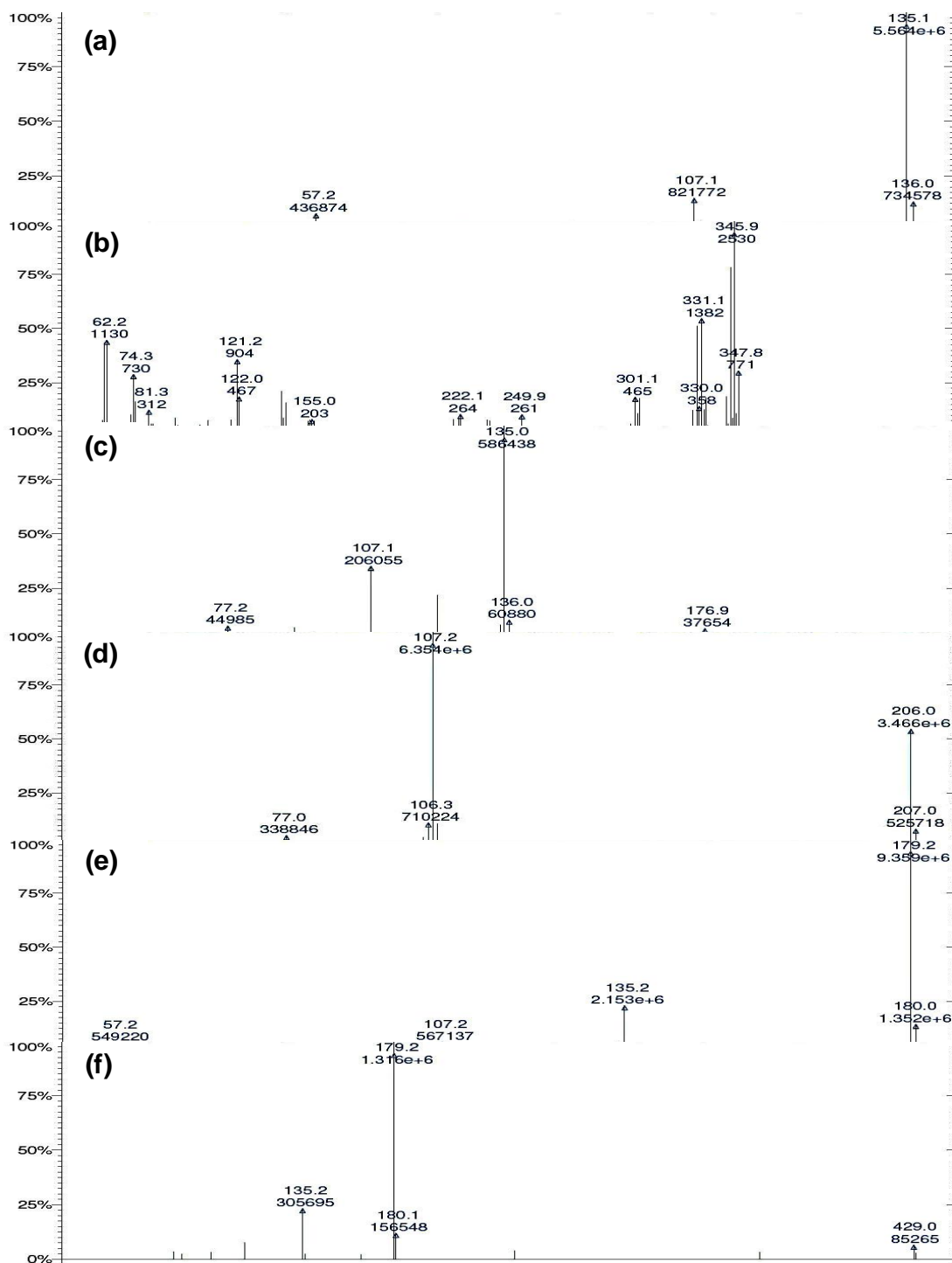


Figura 5 – Espectros de masas: (a) 4-t-OP; (b) TBA; (c) 4-NP; (d) 4-n-OP; (e) 4-OPE; (f) 4-NPE

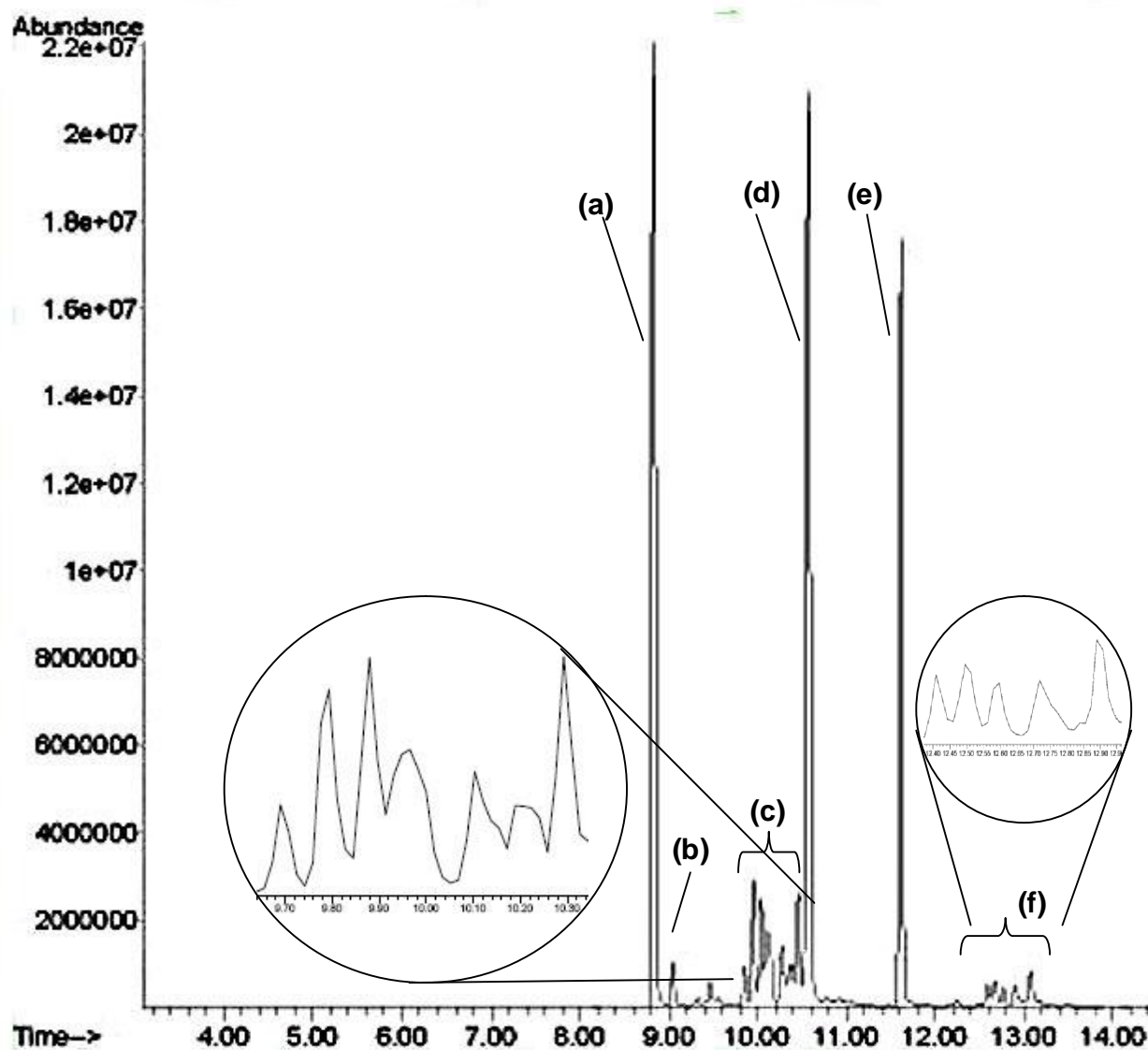


Figura 6 – Cromatograma de mezcla de estándares: (a) 4-t-OP; (b) TBA; (c) 4-NP; (d) 4-n-OP; (e) 4-OPE; (f) 4-NPE

Se observa que la separación de los analitos es superior a la alcanzada por el sistema HPLC-DAD. En cuanto a los compuestos 4-NP y 4-NPE, son mezclas

de isómeros, por lo que en el cromatograma (Figura 6) no aparece un solo pico cromatográfico, sino una serie de pequeños picos cromatográficos sucesivos.

En el caso de 4-NP y 4-NPE, se podría haber optado por la utilización de un estándar específico, y no de la mezcla de isómeros, pero en la práctica, en matrices ambientales, se encuentra con frecuencia la mezcla de isómeros, por lo que se integró sobre la totalidad de estos picos cromatográficos.

Debido a las desventajas que presenta el sistema HPLC–DAD, se optó por la utilización del sistema GC–MSD, para la optimización de los métodos de extracción, y la determinación de estos analitos en las muestras reales de aplicación medioambiental.

V.2. Límites de detección y cuantificación

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación:

Tabla 3 – Determinación de LD y LC (n=9)

Analito	Rango de Concentración [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	B	$S_{R/C}$	R	R^2	LD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	LC [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
4-t-OP	5 – 700	0,47109	0,00834	0,9989	0,9978	50	166
4-NP	5 – 700	0,15756	0,00168	0,9996	0,9992	30	100
4-n-OP	5 – 700	0,45406	0,00719	0,9991	0,9983	44	148
4-OPE	5 – 700	0,17196	0,00274	0,9991	0,9982	45	149
4-NPE	5 – 700	0,03145	0,0006	0,9987	0,9975	54	178

V.3. Método de limpieza de extractos

Para determinar la efectividad del método de limpieza de extractos o *cleanup*, se utilizaron estándares de una concentración cercana a los 2 mg·L⁻¹, disueltos en metanol. En la Tabla 4 se muestran los resultados:

**Tabla 4 – Validación Método de Limpieza de extractos.
(n=2; DE=Desviación Estándar)**

Analito	Conc. Esperada [mg·L⁻¹]	Conc. Recuperada Promedio [mg·L⁻¹]	DE [mg·L⁻¹]	Recuperación [%]
4-t-OP	2,01	1,91	0,02	94,91
4-NP	2,06	2,20	0,05	106,8
4-n-OP	1,96	2,08	0,08	106,1
4-OPE	2,08	2,17	0,06	104,45
4-NPE	2,00	2,16	0,04	108

Se observa que la recuperación es satisfactoria para todos los analitos en estudio.

V.4. Selección del disolvente

Se realizó la extracción de estos compuestos utilizando ultrasonido, con posterior secado, reducción de volumen, limpieza y concentración:

Tabla 5 – Prueba de extractabilidad de disolventes en batch (n=2)

Disolvente	4-t-OP	4-NP	4-n-OP	4-OPE	4-NPE
	[mg·kg ⁻¹]				
Acet	0,7 ± 0,2	121 ± 18	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	13,2 ± 0,4
DCM	0,67 ± 0,02	173 ± 13	2,9 ± 0,4	1,68 ± 0,02	13 ± 2
Hex	0,46 ± 0,05	65 ± 31	1,0 ± 0,6	1,71 ± 0,02	4 ± 2
MetOH	0,38 ± 0,04	16 ± 13	0,27 ± 0,04	1,6 ± 0,1	2,9 ± 0,4
DCM/Acet	0,6 ± 0,1	119 ± 48	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,1	18 ± 2
DCM/MetOH	0,44 ± 0,01	48 ± 2	0,6 ± 0,3	1,66 ± 0,04	1,4 ± 0,3
Hex/Acet	0,60 ± 0,01	126 ± 5	2,3 ± 0,1	1,75 ± 0,01	17,2 ± 0,6
Hex/MetOH	0,40 ± 0,01	21 ± 6	0,22 ± 0,03	1,69 ± 0,02	6,0 ± 0,6

De los disolventes seleccionados, los que mejor extraen al conjunto de analitos para esta matriz en particular, son acetona y diclorometano. De las mezclas de disolventes 1:1 v/v, las que extraen de forma más cuantitativa el conjunto de analitos son las mezclas DCM/Acet, y Hex/Acet.

Dentro del proceso de extracción, la polaridad del disolvente o mezcla de disolventes está fuertemente relacionada con la de los compuestos de interés y la naturaleza de la matriz. De esta forma, algunos disolventes son recomendados para la extracción de analitos específicos, como hexano, en el caso de analitos lipofílicos (alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol de cadena corta), mientras que se requieren disolventes más polares, para la extracción de compuestos hidrofílicos (Petrovic, 2002). En función de esto, los disolventes que deberían extraer de forma cuantitativa estos analitos son hexano y diclorometano, pero se observa que el hexano no extrae tan exhaustivamente como el diclorometano.

Muchas veces un compuesto hidrofóbico está “atrapado” en la matriz por una barrera de moléculas de agua, y en consecuencia la extractabilidad con un disolvente apolar estará disminuida. Ha sido bien documentado que la

extracción de compuestos de baja polaridad desde matrices de alta complejidad, se beneficia por la utilización de mezclas de disolventes apolares y polares, obteniéndose una mayor eficiencia de extracción que si se utilizan disolventes apolares (Richter, 2006). De esta forma, se puede explicar que la mezcla DCM/Acet, y Hex/Acet, hayan resultado en extracciones más cuantitativas.

En numerosos estudios se ha reportado la extractabilidad de distintos disolventes o mezclas de disolventes en diversas matrices. El uso de metanol, acetona y mezclas DCM/Acet (1:1 v/v) no han dado resultados satisfactorios en lodos sanitarios (Meesters, 2002), lo que contrasta claramente con los resultados obtenidos. Por otra parte, a través del uso de mezcla Hex/Acet (1:1 v/v) se han obtenido buenos porcentajes de recuperación en sedimentos (Loyo-Rosales, 2003). Dado que no existe un único disolvente o mezcla de disolventes apto para la extracción de estos compuestos desde matrices diversas, es que pruebas de extractabilidad exploratorias se convierten en una necesidad. A pesar de que las extracciones realizadas se hicieron en condiciones suaves, dan una buena aproximación de su efectividad en condiciones más drásticas.

V.5. Optimización de Variables de Extracción con Disolventes Presurizados en Batch (ASE® 100)

Para la optimización de la extracción con disolventes presurizados en batch, se consideraron las siguientes variables, inherentes al rango de trabajo del equipo utilizado:

Temperatura: 40 – 200 °C

Tiempo Estático: 5 – 60 min

% de Disolvente: 0 – 100% Acetona y 0 – 100% DCM

0 – 100% Acetona y 0 – 100% Hexano

Debido a que acetona, diclorometano, hexano, y las mezclas 1:1 v/v DCM/Acet y Hex/Acet, resultaron ser buenos disolventes de extracción, se consideró como una variable a optimizar la proporción que debe haber entre ellos. Teniendo en cuenta que el porcentaje de acetona varía en comparación a hexano y diclorometano, la variable a optimizar es el porcentaje de acetona, respecto de los otros dos disolventes, considerando una mezcla binaria en volumen.

Las variables de trabajo que se seleccionaron, considerando las recomendaciones del fabricante, y las condiciones estándar de la mayoría de los métodos preprogramados en el extractor, fueron:

Tiempo de purga: 100 seg

Nº de ciclos estáticos: 2

Volumen de celda: 10 mL

Volumen de lavado: 100%

Cantidad de muestra: 0,5 g

La presión de trabajo viene fija por defecto en 1650 ± 50 psi

Para la optimización, se utilizó un “Diseño central compuesto circunscrito” (CCD):

$$2^N + 2 \cdot N + C(N)$$

Donde **N:** Número de factores experimentales

C: Número de puntos centrales

De esta forma, el número de experimentos estaría dado por:

$$2^3 + 2 \cdot 3 + 3$$

Con lo que se realizaron 17 experimentos, en un bloque. La matriz codificada de experimentos es la siguiente:

Tabla 6 – Matriz de optimización codificada

Experimento	Temperatura	Tiempo Estático	% Acetona
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

La codificación se utiliza para dar el mismo peso estadístico a todos los factores. Así, la matriz de experimentos expresados en sus valores naturales, sería:

Tabla 7 – Matriz de optimización en valores naturales

Experimento	Temperatura [°C]	Tiempo Estático [min]	% Acetona
1	72	16	80
2	166	16	80
3	72	49	80
4	166	49	80
5	72	16	20
6	166	16	20
7	72	49	20
8	166	49	20
9	40	33	50
10	200	33	50
11	120	5	50
12	120	60	50
13	120	33	100
14	120	33	0
15	120	33	50
16	120	33	50
17	120	33	50

V.5.1. Mezclas acetona/diclorometano

Para las diferentes mezclas acetona/diclorometano, los resultados se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8 – Matriz de resultados, mezclas Acet/DCM

Experimento	4-t-OP	4-NP	4-n-OP	4-OPE	4-NPE
	[mg·kg ⁻¹]				
1	4,60	334,08	31,68	10,36	160,70
2	3,26	291,89	29,57	11,03	1056,68
3	3,54	254,30	28,76	9,78	170,42
4	5,95	209,50	32,59	8,55	499,89
5	2,33	269,66	6,43	2,18	116,73
6	2,11	265,01	6,27	2,18	231,34
7	2,17	319,18	6,45	1,66	147,83
8	1,96	272,81	5,90	1,52	91,03
9	1,77	223,68	5,08	1,30	80,40
10	1,41	155,10	4,22	1,73	96,25
11	1,97	285,00	5,19	1,44	141,13
12	9,61	293,51	55,99	15,24	234,74
13	4,34	268,68	25,96	11,74	684,31
14	4,55	329,26	32,49	11,69	1220,10
15	4,24	345,51	25,62	10,91	1187,42
16	3,91	353,46	25,10	11,25	1240,83
17	3,73	332,53	30,86	11,02	1134,02

Para cada analito, los gráficos de Pareto estandarizados (Figura 7), entregan información sobre la significancia estadística de cada una de las variables en el proceso de optimización.

Respecto del porcentaje de acetona, en comparación con el porcentaje de diclorometano, fue significativo en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. Se observa que en la medida que aumenta la proporción de acetona en la mezcla acetona/diclorometano, la extracción de estos compuestos es menor.

Por otra parte, la temperatura resultó significativa sólo en el caso de los compuestos que se encuentran en mayor concentración en el lodo utilizado, mientras que el tiempo estático y la proporción de acetona resultaron

significativos en los compuestos que se encuentran en menor concentración en el lodo utilizado para los efectos de optimización.

Se observa que la variable temperatura, fue significativa sólo en el caso de 4-NP y 4-NPE. Cuando la temperatura de extracción se eleva, la extractabilidad del 4-NP disminuye, al contrario del 4-NPE, donde ejerce una influencia positiva en su extracción.

El tiempo estático de extracción fue significativo en 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. En la medida que aumentó el tiempo en que se realizó la extracción, la extracción de estos compuestos fue mayor.

Las interacciones entre variables, tienen un comportamiento particular para cada compuesto: para la interacción entre la temperatura y el tiempo estático, fue significativa en los compuestos 4-t-OP, 4-OPE y 4-NPE. En el caso de la interacción entre la temperatura y la proporción de acetona, resultó significativa sólo en el caso de 4-NPE. En la interacción entre el tiempo estático y el porcentaje de acetona, fue significativa sólo en 4-NP.

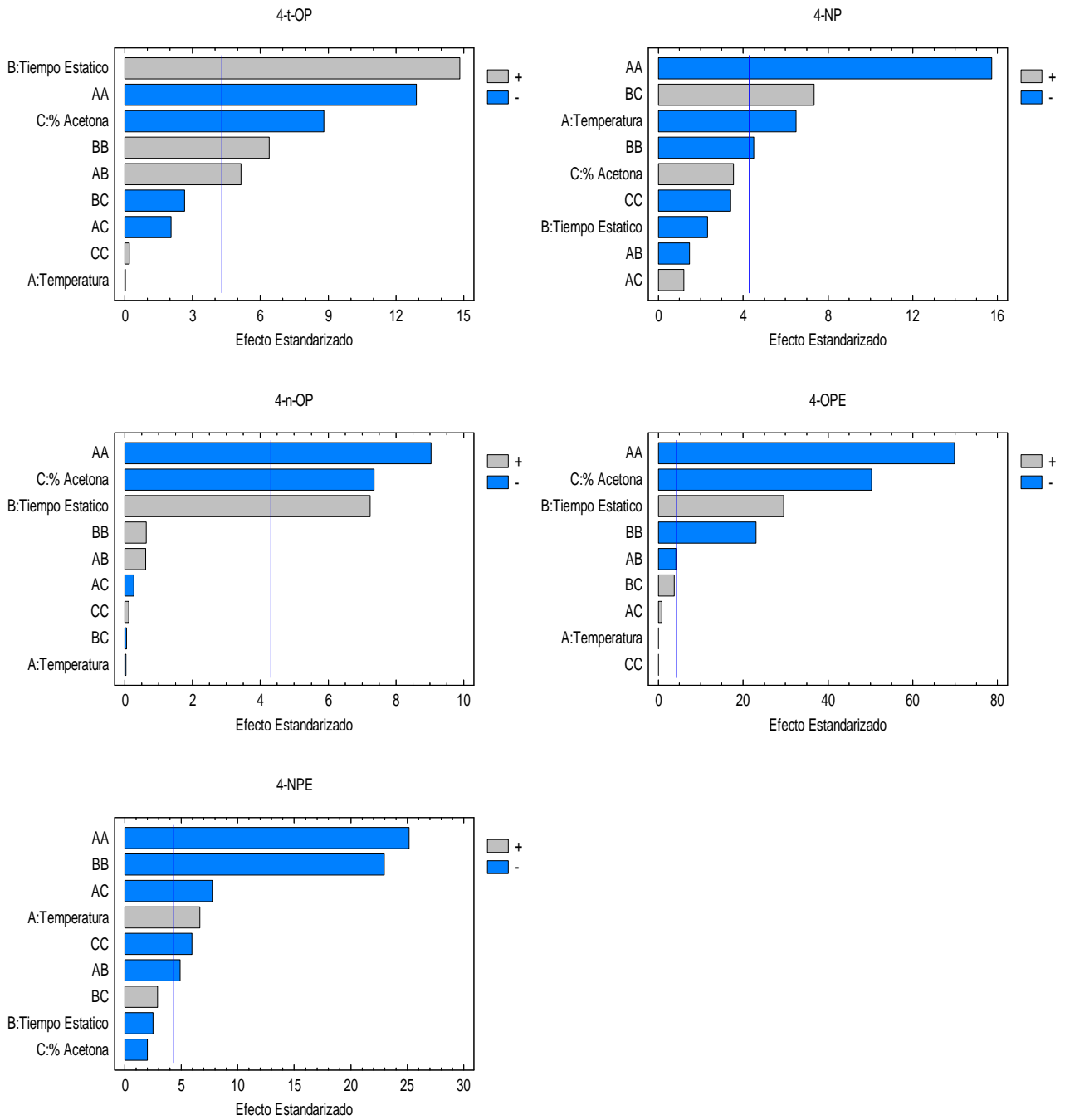


Figura 7 – Gráficos de Pareto estandarizados para cada uno de los analitos

El resumen de la significancia estadística de cada una de las variables con respecto a cada uno de los compuestos en estudio se encuentra en la Tabla 9:

Tabla 9 – Resumen de significancia estadística: (+) Interacción Positiva; (-) Interacción Negativa; (NS) No Significativa

Analito	A: Temperatura	B: Tiempo Estático	C: % Acetona	AA	BB	CC	AB	AC	BC
4-t-OP	NS	+	-	-	+	NS	+	NS	NS
4-NP	-	NS	NS	-	-	NS	NS	NS	+
4-n-OP	NS	+	-	-	NS	NS	NS	NS	NS
4-OPE	NS	+	-	-	-	NS	-	NS	NS
4-NPE	+	NS	NS	-	-	-	-	-	NS

Se realizó un análisis de varianza, obteniéndose los siguientes parámetros del modelo de ajuste, por cada analito, por separado: Coeficiente de determinación (R^2) y Carencia de ajuste,

Tabla 10 – Valores de R^2 y carencia de ajuste para cada analito

Analito	R^2 [%]	Carencia de Ajuste (P-Value)
4-t-OP	64,55	0,0147
4-NP	92,05	0,1505
4-n-OP	58,62	0,0342
4-OPE	67,44	0,0012
4-NPE	86,01	0,0284

Si el p-value para la carencia de ajuste es menor a 0,05, existe una carencia de ajuste estadísticamente significativa, a un 95% de confianza, por lo que el modelo de ajuste puede no representar adecuadamente los datos. Esto ocurre en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP, 4-OPE y 4-NPE. No obstante, se observa que el coeficiente de determinación es superior al 50% en todos los compuestos, y en el caso de los compuestos que se encuentran en mayor concentración (4-NP y 4-NPE), es cercano al 90%.

Los valores óptimos predichos por el modelo, son los siguientes:

Tabla 11 – Valores óptimos de cada variable, para cada compuesto

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Acetona	
	Valor codificado	Valor natural [°C]	Valor Codificado	Valor natural [min]	Valor codificado	Valor natural [%]
4-t-OP	0,628489	149	1,68179	60	-1,68179	100
4-NP	-0,19471	110	1,43461	56	1,68179	0
4-n-OP	-0,122775	114	1,68179	60	-1,68179	100
4-OPE	-0,026816	118	0,418648	40	-1,68179	100
4-NPE	0,191419	129	-0,0989061	31	-0,329794	60

Se observa que la temperatura óptima de extracción de cada analito no difiere en gran medida del resto. Respecto de las otras variables óptimas, no hay una tendencia clara en cuanto a los valores óptimos para cada variable, por lo que se procedió a agrupar los analitos por tipo de compuesto, y agrupar los analitos totalmente.

Tabla 12 – Valores óptimos de cada variable, para cada grupo de compuestos

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Acetona	
	Valor codificado	Valor natural [°C]	Valor Codificado	Valor natural [min]	Valor Codificado	Valor natural [%]
4-t-OP						
4-NP	-0,0397385	118	1,08134	50	-1,68179	100
4-n-OP						
4-OPE	0,329257	135	-0,106371	31	-1,36635	91
4-NPE						

Se encontró que no existen diferencias notables respecto de la temperatura óptima de extracción, entre grupos de compuestos y el total de los compuestos. El tiempo estático de cada ciclo está influenciado por el 4-NPE, principalmente. Respecto del disolvente de extracción, la acetona resulta el disolvente óptimo para la mayoría de los compuestos.

Al agrupar todos los analitos, se determinó la función de deseabilidad de Derringer (D), la cual nos entrega una condición de compromiso óptima entre las respuestas de cada analito, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$D = 0,644 + 0,019 \cdot T + 0,049 \cdot TE - 0,078 \cdot A - 0,230 \cdot T^2 - 0,015 \cdot T \cdot TE - 0,039 \cdot T \cdot A - 0,111 \cdot TE^2 + 0,016 \cdot TE \cdot A - 0,019 \cdot A^2$$

Donde **T:** Temperatura
TE: Tiempo Estático
A: % de Acetona

Este modelo presenta un coeficiente de determinación (R²) de un 73,39%.

En el gráfico de Pareto (Figura 8) se observa que al agrupar las respuestas de todos los compuestos en la función de deseabilidad, todas las variables resultan significativas, por lo que el modelo no puede ser simplificado.

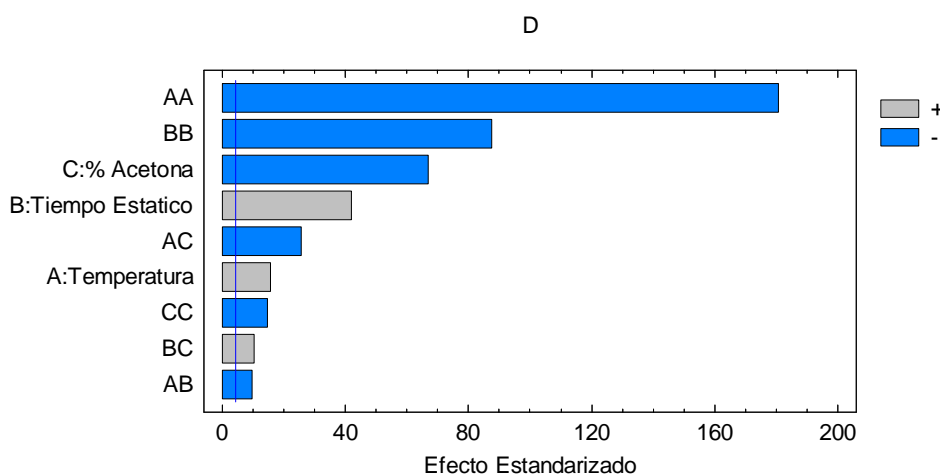


Figura 8 – Gráfico de Pareto estandarizado para la función de deseabilidad de Derringer (D)

Al observar la superficie de respuesta estimada (Figura 9), se aprecia que en la medida que aumenta la temperatura, hasta un valor cercano al valor central del rango utilizado, se alcanza un valor óptimo, para luego decrecer nuevamente. De igual forma, en la medida que nos acercamos a un valor intermedio del rango de tiempo estático, llegamos a un valor óptimo.

En la Tabla 13, se entregan los valores óptimos de extracción, una vez que los compuestos se han agrupado en la función de deseabilidad de Derringer.

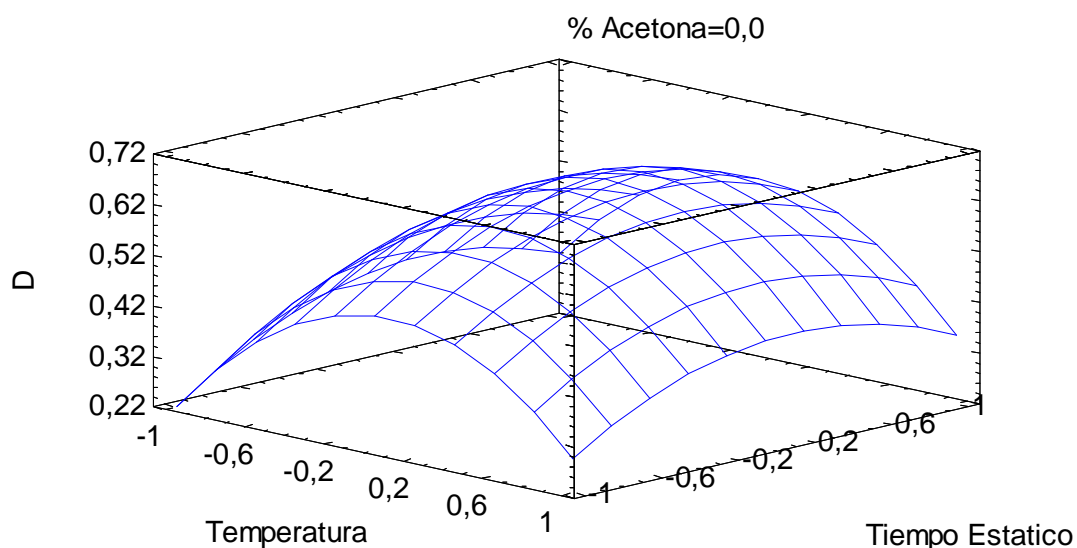


Figura 9 – Superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad de Derringer (D)

Tabla 13 – Valores óptimos de cada variable, para todos los compuestos agrupados

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Acetona	
	Valor Codificado	Valor natural [°C]	Valor Codificado	Valor natural [min]	Valor Codificado	Valor natural [%]
Todos	0,179747	129	0,0854945	34	-1,68179	100

Se realizó la extracción por ASE de los analitos desde el material de referencia, utilizando las condiciones óptimas predichas para el conjunto total de compuestos (n=6). Además, se realizó una extracción Soxhlet en duplicado, utilizando como disolvente acetona, ya que fue el recomendado por el modelo, para la extracción del conjunto de analitos:

Tabla 14 – Extracción en condiciones óptimas

Analito	ASE		Soxhlet	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
4-t-OP	1,2	0,1	1,22	0,04
4-NP	204	20	298	7
4-n-OP	54	4	6,4	0,4
4-OPE	16	1	0,3	0,1
4-NPE	1053	23	621	18

Se observa que la extracción con disolventes presurizados en batch, bajo las condiciones óptimas, resulta superior a la extracción por Soxhlet, en el caso de 4-n-OP, 4-OPE y 4-NPE. En el caso del 4-NP, la metodología optimizada es inferior en cuanto a la extracción de este compuesto, en comparación con el sistema Soxhlet. Ambas metodologías son comparables en el caso de 4-t-OP.

V.5.2. Mezclas acetona/hexano

Para las distintas mezclas acetona/hexano, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 15 – Matriz de resultados, mezclas acet/hex

Experimento	4-t-OP	4-NP	4-n-OP	4-OPE	4-NPE
	[mg·kg ⁻¹]				
1	6,87	271,91	17,71	13,31	664,23
2	3,28	278,91	9,74	3,88	607,37
3	2,65	214,82	7,76	2,44	468,25
4	2,90	263,62	8,55	2,99	604,79
5	2,70	261,71	7,48	2,14	519,60
6	3,04	334,59	9,03	2,66	804,76
7	23,78	287,67	53,59	17,31	588,76
8	5,68	287,33	12,11	5,12	686,52
9	2,88	245,63	8,17	2,05	325,49
10	3,01	260,50	8,00	3,59	593,23
11	2,85	264,18	8,09	2,45	615,46
12	2,60	248,89	7,86	1,96	490,78
13	2,97	291,71	8,87	2,62	709,46
14	2,91	302,90	8,74	2,63	711,40
15	2,70	256,10	7,94	2,50	613,62
16	2,95	310,54	9,06	2,71	758,03
17	2,80	273,04	8,28	2,59	674,05

En los gráficos de Pareto estandarizados para cada analito (Figura 10), se observa la significancia estadística de cada variable. En el caso de la temperatura de extracción, fue significativa en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE, ejerciendo una influencia negativa sobre la extracción de estos compuestos, lo que implica que en la medida que aumenta la temperatura, disminuye la extracción de los analitos. Este comportamiento no se observó en el mismo grupo de analitos, al hacer los experimentos utilizando las mezclas variables de Acet/DCM.

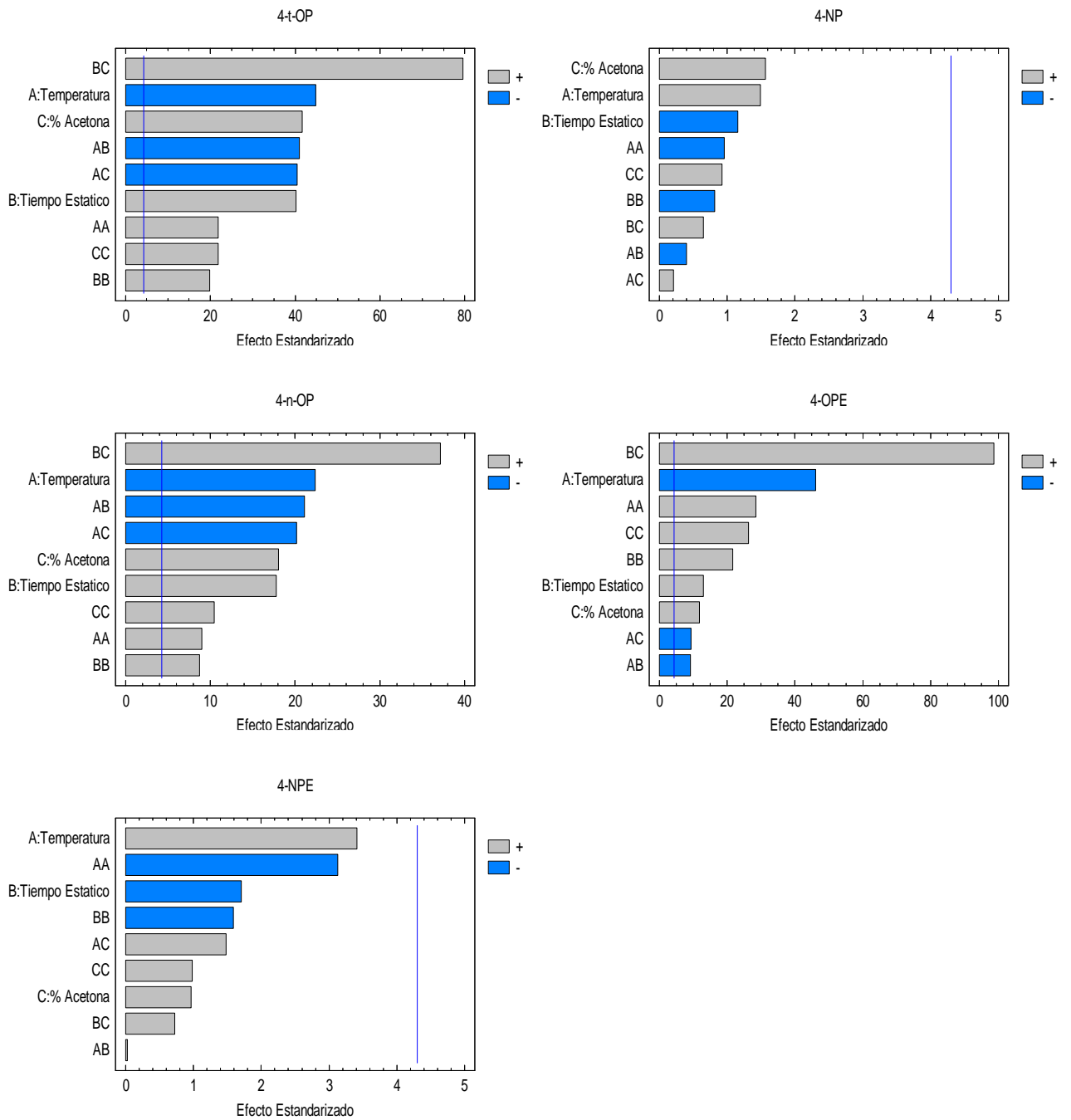


Figura 10 – Gráficos de Pareto estandarizados para cada uno de los analitos

El tiempo estático de extracción resultó significativo en 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE, afectando de forma positiva, de manera que al aumentar la temperatura, la extracción de estos compuestos se vio favorecida. Este mismo comportamiento se observó al hacer los experimentos utilizando las mezclas variables de Acet/DCM.

Respecto del porcentaje de acetona, en comparación con el porcentaje de hexano, fue significativo en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE, ejerciendo una influencia positiva, por lo tanto, en la medida que aumentó el porcentaje de hexano en desmedro de la cantidad de acetona, la extracción de estos compuestos fue mayor, lo que contrasta con el comportamiento observado al hacer los experimentos utilizando las mezclas variables de Acet/DCM.

Acerca de las interacciones entre variables, la interacción entre la temperatura y el tiempo estático, fue significativa en los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. La interacción entre la temperatura y el porcentaje de acetona resultó significativa en los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE.

La interacción entre el tiempo estático y el porcentaje de acetona, también fue significativa en los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE.

Las interacciones entre variables sólo fueron significativas en los analitos que se encontraban en una menor concentración relativa, respecto del 4-NP y 4-NPE.

La influencia de las variables y sus interacciones, pueden ser resumidas en la Tabla 16:

Tabla 16 – Resumen de significancia estadística: (+) Interacción Positiva; (-) Interacción Negativa; (NS) No Significativa

Analito	A: Temperatura	B: Tiempo Estático	C: % Acetona	AA	BB	CC	AB	AC	BC
4-t-OP	-	+	+	+	+	+	-	-	+
4-NP	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4-n-OP	-	+	+	+	+	+	-	-	+
4-OPE	-	+	+	+	+	+	-	-	+
4-NPE	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

El análisis de varianza, entrega los parámetros de coeficiente de determinación (R^2), y carencia de ajuste, para cada uno de los analitos:

Tabla 17 – Valores de R^2 y carencia de ajuste para cada analito

Analito	R^2 [%]	Carencia de Ajuste (P-Value)
4-t-OP	60,42	0,0005
4-NP	62,25	0,6369
4-n-OP	59,89	0,0021
4-OPE	51,59	0,0004
4-NPE	80,80	0,5171

Dado que el p-value para la carencia de ajuste es menor a 0,05, existe una carencia de ajuste estadísticamente significativa, a un 95% de confianza, por lo que el modelo de ajuste puede no representar adecuadamente los datos en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. A pesar de esto, el coeficiente de

determinación da cuenta de un ajuste superior al 50% en todos los compuestos, especialmente en los compuestos que se encuentran en mayor concentración. Los valores óptimos predichos para cada variable, por analito, son los siguientes:

Tabla 18 – Valores óptimos de cada variable, para cada compuesto

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Acetona	
	Valor Codificado	Valor natural [°C]	Valor codificado	Valor natural [min]	Valor codificado	Valor natural [%]
4-t-OP	-1,68179	40	1,68179	60	1,41079	8
4-NP	0,955578	165	-0,129726	31	1,68179	0
4-n-OP	-1,68179	40	1,68179	60	1,41079	8
4-OPE	-1,64409	42	1,68179	60	1,68179	0
4-NPE	0,966747	165	-0,0193051	32	1,68179	0

La temperatura y el tiempo estático de extracción, varían según el analito, sin observarse relación entre el tipo de compuesto y la temperatura necesaria para su extracción cuantitativa. Se recomienda extraer 4-NP y 4-NPE a mayores temperaturas (165°C), pero utilizando un menor tiempo estático (31–32 min). En el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE son extraíbles a temperaturas de alrededor de 40°C, lo que puede relacionarse con su baja concentración presente en el material de referencia, en comparación con 4-NP y 4-NPE, utilizándose un mayor tiempo estático (60 min).

En cuanto al disolvente, se observa que en todos los analitos, se recomienda el uso de un alto porcentaje de hexano, inclusive la extracción en ausencia de acetona.

Se procedió a agrupar los analitos por tipo de compuesto, y agrupar los analitos totalmente, para determinar la función de deseabilidad de Derringer (D), que nos entrega una condición de compromiso óptima entre las respuestas de cada compuesto. De esta forma, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$D = 0,127 - 0,028 \cdot T + 0,024 \cdot TE + 0,043 \cdot A + 0,015 \cdot T^2 - 0,034 \cdot T \cdot TE - 0,032 \cdot T \cdot A + 0,022 \cdot TE^2 + 0,159 \cdot TE \cdot A + 0,043 \cdot A^2$$

Donde **T:** Temperatura
 TE: Tiempo Estático
 A: % de Acetona

Este modelo presenta un coeficiente de determinación (R^2) de 52,44%.

El gráfico de Pareto estandarizado para la función de deseabilidad (Figura 11), muestra que al agrupar las respuestas de todos los compuestos, las variables que resultan significativas son el porcentaje de acetona en la mezcla Acet/Hex, y la interacción entre el tiempo estático y el porcentaje de acetona.

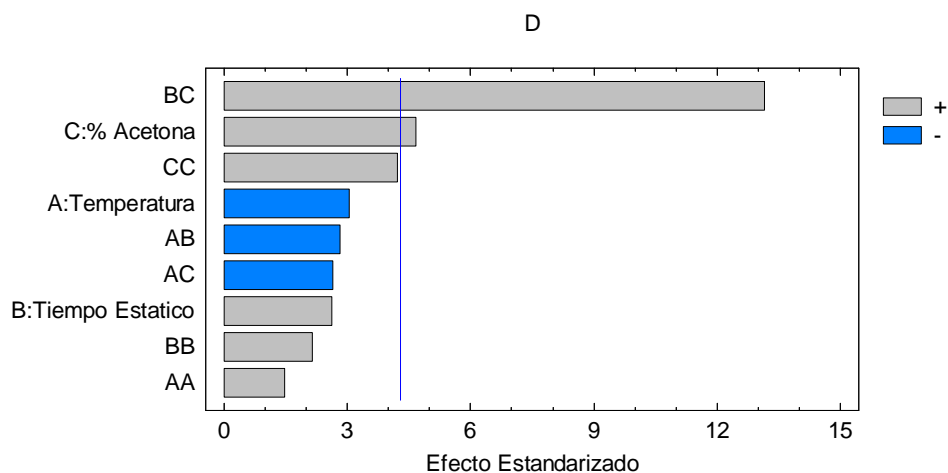


Figura 11 – Gráfico de Pareto estandarizado para la función de deseabilidad de Derringer (D)

En función de lo anterior, el modelo puede ser simplificado a una ecuación más sencilla,

$$D = 0,127 + 0,043 \cdot A + 0,159 \cdot TE \cdot A$$

En la superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad (Figura 12) se observa que en la medida que la temperatura de extracción disminuye, se alcanza un valor óptimo. Respecto del tiempo estático, en la medida que aumenta, llegamos a un valor óptimo. Estos valores predichos, para cada variable, se encuentran en la Tabla 19.

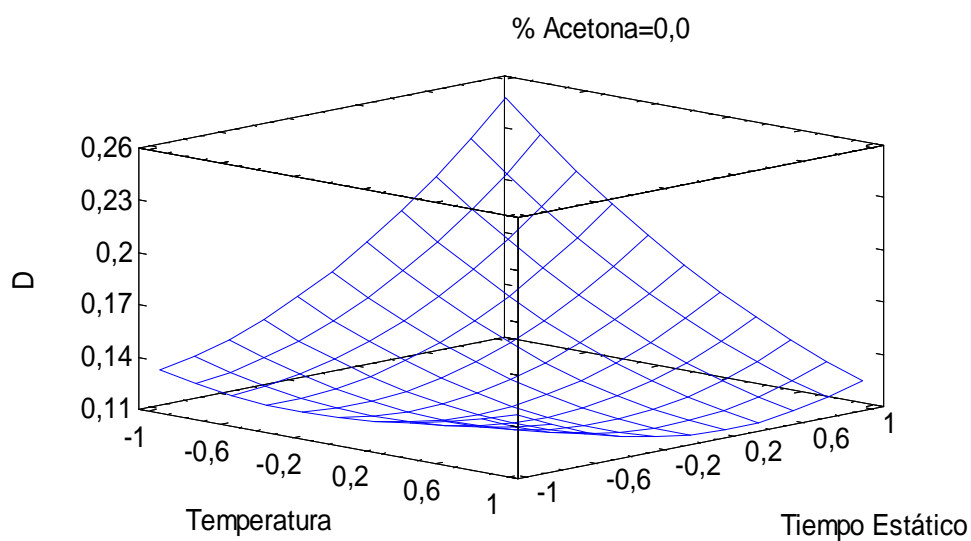


Figura 12 – Superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad de Derringer (D)

Si se agrupan los compuestos (Tabla 19), se observa que la temperatura de extracción influye más para la extracción de los fenoles, en cambio, el tiempo estático de cada ciclo fue más importante en la extracción de los etoxilatos. Respecto del disolvente de extracción, el hexano resultó ser el disolvente más adecuado para todos los compuestos.

Tabla 19 – Valores óptimos de cada variable, para cada grupo de compuestos

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Acetona	
	Valor codificado	Valor natural [°C]	Valor codificado	Valor natural [min]	Valor codificado	Valor natural [%]
4-t-OP						
4-NP	-1,68179	40	1,5158	57	1,68179	0
4-n-OP						
4-OPE	0,398531	139	1,68179	60	1,68179	0
4-NPE						
Todos	-1,63826	42	1,68179	60	1,68179	0

Se realizó la extracción por ASE de los analitos desde el material de referencia, utilizando las condiciones óptimas predichas para el conjunto total de compuestos (n=6). Además, se realizó una extracción Soxhlet en duplicado, utilizando hexano como disolvente, ya que fue el recomendado por el modelo, para la extracción del conjunto de analitos:

Tabla 20 – Extracción 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP, 4-OPE y 4-NPE en condiciones óptimas

Analito	ASE		Soxhlet	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
4-t-OP	1,4	1,6	1,2	0,4
4-NP	162	20	180	2
4-n-OP	3,3	0,8	4	1
4-OPE	0,4	0,3	1	1
4-NPE	730	30	635	13

Se observa que la extracción con disolventes presurizados en batch, bajo las condiciones óptimas, resulta comparable a la extracción por Soxhlet.

Se compararon las extracciones en las condiciones óptimas predichas para cada sistema (Figuras 13 y 14):

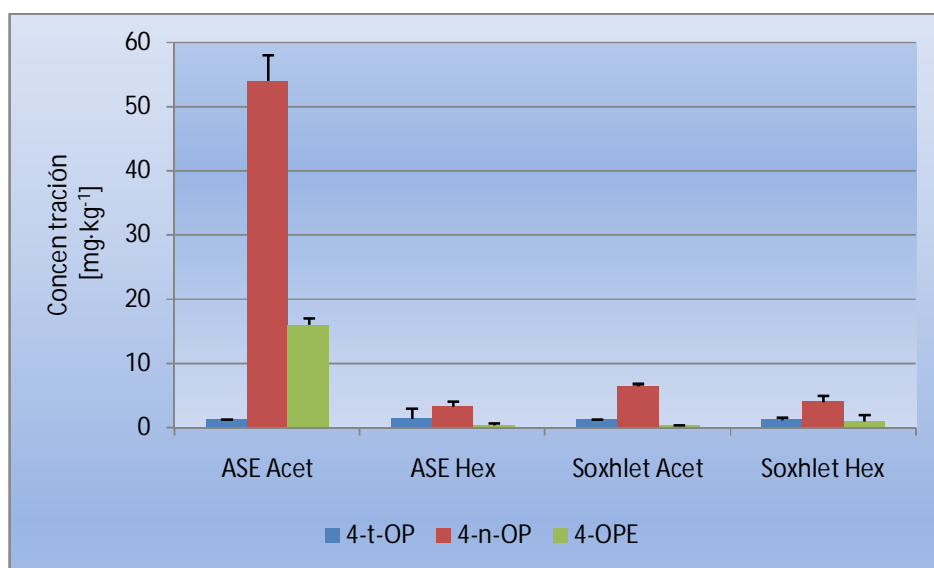


Figura 13 – Comparación de extracción por métodos en condiciones óptimas, para los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE, desde lodo de referencia

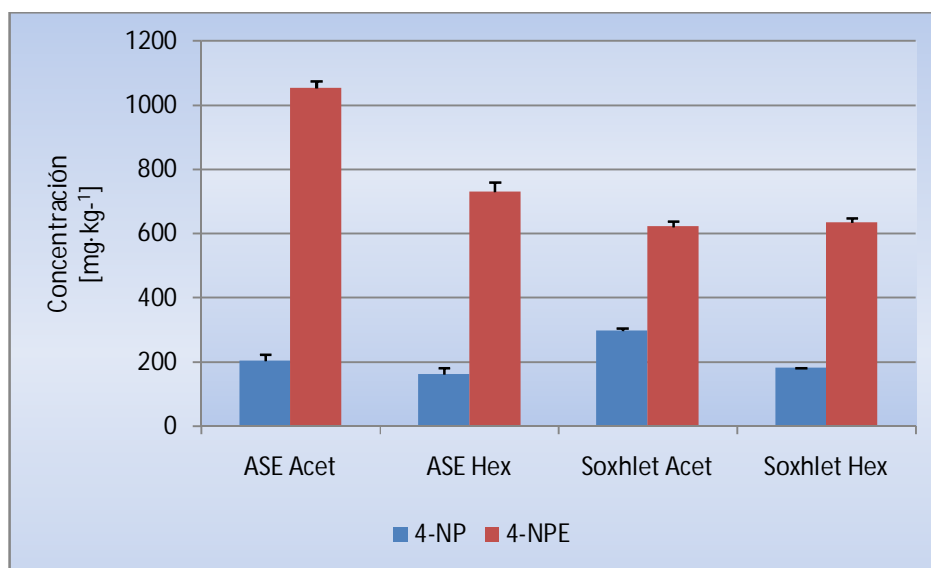


Figura 14 – Comparación de extracción por métodos en condiciones óptimas, para los compuestos 4-NP y 4-NPE, desde lodo de referencia

Se observa que al utilizar acetona como disolvente de extracción, se obtuvieron mejores resultados, tanto en el caso del método optimizado, como en la extracción Soxhlet.

Debido a que la extracción con acetona, en las condiciones óptimas predichas por el modelo, resultó ser mejor método que la extracción Soxhlet, se eligió este disolvente para seguir con los estudios de optimización de la extracción, y de aplicación medioambiental.

Al comparar las condiciones de extracción optimizadas de ambos sistemas, utilizando las distintas mezclas de disolventes (Tabla 21), se observa que difieren en todas las variables:

Tabla 21 – Valores óptimos de cada variable, para los sistemas Acet/DCM y Acet/Hex

Sistema	Temperatura [°C]	Tiempo Estático [min]	Acetona [%]
Acet/DCM	129	34	100
Acet/Hex	42	60	0

Se esperaría una concordancia entre las condiciones óptimas predichas para cada optimización, debido a que se utiliza una mezcla binaria de acetona, y otro disolvente, ya sea diclorometano o hexano, los cuales son semejantes en cuanto a su polaridad, y miscibles entre sí.

Cuando se utiliza sólo acetona como disolvente de extracción, la temperatura óptima recomendada es de 129°C, más alta que su temperatura de ebullición (Tabla 22). Bajo esta condición, el disolvente se encontraría en estado gaseoso. Si bien esta temperatura está lejos de su temperatura crítica, la presión del sistema de extracción ASE (~1700psi), supera ampliamente la presión crítica del disolvente (Tabla 22), por lo que el disolvente se encontraría en estado líquido, como fluido sobrecalentado, aunque sin llegar a ser un fluido supercrítico.

Tabla 22 – Algunas propiedades fisicoquímicas de algunos disolventes de extracción. ((a)Reichardt, 2003; (b)Lide, 2004)

Disolvente	Temperatura de ebullición ^(a) [°C]	Momento dipolar ^(a) μ (*10 ³⁰) [Cm]	Permitividad relativa ^(a) ϵ_r	Temperatura crítica ^(b) T _c [°C]	Presión crítica ^(b) P _c [psi]
Agua	100	6,2	78,36	374,14	3199,53
Acetona	56,1	9,0	20,56	235,1	681,68
Diclorometano	39,4	3,8	8,93	237	884,73
Hexano	68,7	0,0	1,88	234,6	438,74

Bajo estas condiciones, la acetona tendría una permitividad relativa menor, por lo que su polaridad también habría disminuido. Estos fenómenos han sido estudiados ampliamente en agua sobrecalentada (Reichardt, 2003).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el proceso de extracción con acetona a 129 °C, en dos ciclos de 34 minutos cada uno, sería equivalente al proceso de extracción con hexano, a temperatura levemente más alta que su punto de ebullición, en dos ciclos de 60 minutos cada uno. Por otra parte, la elección entre diclorometano y hexano, puede obedecer a la capacidad de solvatación de cada uno frente a los compuestos en estudio. De esta forma, el hexano solvataría de mejor forma la parte alifática de los alquilfenoles y sus etoxilatos, que el diclorometano, cuyos cloruros pueden ejercer un impedimento estérico importante, comparado con la cadena alquílica del hexano, en las condiciones de extracción del sistema.

La variación de la permitividad relativa de la acetona tiene su paralelo en el tratamiento del agua, ya sea en condiciones de agua sobrecalentada, subcrítica o supercrítica.

La dependencia de la permitividad relativa con la temperatura es generalmente negativa y poco marcada, principalmente debido al aumento de la aleatorización térmica, por lo tanto, disminuye la cooperación entre los dipolos, en la medida que se eleva la temperatura. En rangos de temperatura moderados, el cambio relativo con la temperatura, $d \ln \epsilon/dT$, es independiente de la temperatura, pero varía en rangos mayores. La dependencia de la permitividad relativa con la presión, ha sido determinada para pocos disolventes, aunque es una cantidad importante en tratamientos teóricos de volúmenes molares parciales de soluciones de electrolito y otras cantidades, que involucran partículas cargadas en solución (Marcus, 1998).

De esta forma, se han formulado múltiples métodos de calcular la permitividad relativa del agua:

- a) La permitividad relativa es una función polinomial de la temperatura (Lide, 2004), con una ecuación de la forma:

$$\epsilon_r(T) = a + b \cdot T + c \cdot T^2 + d \cdot T^3$$

Donde T es la temperatura absoluta en K; a, b, c y d son coeficientes propios de la sustancia. El coeficiente d se utiliza en muy pocos casos, en donde el ajuste cuadrático no es satisfactorio.

- b) El logaritmo natural de la permitividad relativa se relaciona de manera inversamente proporcional con la temperatura del fluido en estudio (Jouyban et al., 2004).

- c) El logaritmo de $(\epsilon_r - 1)$ se relaciona directamente con el logaritmo de la densidad del fluido en estudio (Marshall, 2008).

En el primer modelo, los coeficientes de la ecuación de ajuste polinomial para la acetona, son los siguientes (Tabla 23):

Tabla 23 – Condiciones y constantes para acetona (Lide, 2004)

T [K]	ϵ_r	a	b	c	Rango de Temperatura [K]
293,2	21,01	88,157	-0,343	3,8925E-4	273 – 323

Los coeficientes de la ecuación de regresión pueden ser usados para calcular la permitividad relativa dentro del rango de temperatura especificado. A pesar de esto, la permitividad relativa de la acetona a la temperatura de extracción (129 °C) puede ser estimada en 13,18, observándose una disminución de la permitividad relativa de la acetona al aumentar la temperatura de extracción, aunque sin llegar a valores cercanos a la permitividad relativa del hexano. Sin embargo, este valor obtenido de esta forma es erróneo, ya que el ajuste polinomial se realizó en un rango de temperatura en el cual la presión del sistema correspondió a la presión atmosférica, cuando fue menor al punto normal de ebullición, y a la presión de vapor saturado, a temperaturas a continuación del punto de ebullición normal del disolvente. En cambio, la presión a la cual se realizó la extracción fue de 1650 ± 50 psi, muy superior a las presiones consideradas en el modelo.

Debido a que la temperatura, y la presión de extracción del sistema se encuentran fuera del rango de temperatura utilizado para hacer la regresión, estos coeficientes no pueden ser utilizados para determinar la permitividad relativa de la acetona en las condiciones de extracción, ya que se debería extrapolar fuera de este rango (Lide, 2004).

En el caso del segundo modelo, se tomaron datos experimentales de permitividad relativa del agua, a diferentes temperaturas y presiones (Tabla 24), se correlacionaron, de manera de predecir la permitividad relativa del agua en condiciones críticas.

En la Tabla 24, la presión en [kPa] fue transformada en unidades de psi, con el objeto de trabajar en la misma escala del equipo de extracción.

Se observa que la presión no influye en la permitividad relativa del agua, en el rango de temperatura y presión en que se encuentran tabulados los datos.

Tabla 24 – Permitividad relativa del agua a distintas temperaturas y presiones (Anderson y col., 2000)

Temperatura [K]	Presión [kPa]	Presión [psi]	Permitividad Relativa ϵ_r
301,65	100,00	14,51	77,17
301,65	1000,00	145,07	77,20
301,65	4060,00	589,00	77,31
301,65	6959,00	1009,57	77,41
301,65	9909,00	1437,54	77,52
301,65	12160,00	1764,10	77,60
308,14	100,00	14,51	74,92
308,14	1000,00	145,07	74,95
308,14	3995,00	579,57	75,05
308,14	7025,00	1019,15	75,16
308,14	10009,00	1452,05	75,27
308,14	12572,00	1823,87	75,36
318,10	100,00	14,51	71,62
318,10	1005,00	145,80	71,65
318,10	4030,00	584,65	71,75
318,10	6995,00	1014,79	71,85
318,10	10010,00	1452,19	71,96
318,10	12350,00	1791,67	72,04
328,52	100,00	14,51	68,30
328,52	1007,00	146,09	68,34
328,52	4012,00	582,04	68,44
328,52	7018,00	1018,13	68,54
328,52	9975,00	1447,12	68,64
328,52	12665,00	1837,37	68,73
337,77	98,00	14,22	65,51
337,77	1005,00	145,80	65,54
337,77	4012,00	582,04	65,64
337,77	6999,00	1015,38	65,74
337,77	9965,00	1445,67	65,84
337,77	11765,00	1706,80	65,90

Este modelo, no considera la presión del sistema, por lo que la correlación entre $\ln \epsilon_r$ vs $1/T$, debe hacerse en condiciones isobáricas (Tabla 25):

Tabla 25 – Relación entre Ln ϵ_r vs 1/T

T [K]	P [psi]	Permitividad Relativa ϵ_r	Ln ϵ_r	1/T [K ⁻¹]	Ecuación	R ²	ϵ_r Calculada	% ϵ_r
301,65	14,51	77,17	4,346	3,32E-03	Ln $\epsilon_r = 461,54 * (1/T) + 2,818$	0,999	77,33	-0,21
308,14	14,51	74,92	4,316	3,25E-03			74,88	0,05
318,10	14,51	71,62	4,271	3,14E-03			71,44	0,25
328,52	14,51	68,30	4,224	3,04E-03			68,23	0,10
337,77	14,22	65,51	4,182	2,96E-03			65,66	-0,22
301,65	145,07	77,20	4,346	3,32E-03	Ln $\epsilon_r = 461,4 * (1/T) + 2,819$	0,999	77,35	-0,20
308,14	145,07	74,95	4,317	3,25E-03			74,90	0,06
318,10	145,80	71,65	4,272	3,14E-03			71,47	0,25
328,52	146,09	68,34	4,224	3,04E-03			68,26	0,12
337,77	145,80	65,54	4,183	2,96E-03			65,68	-0,21
301,65	589,00	77,31	4,348	3,32E-03	Ln $\epsilon_r = 461,09 * (1/T) + 2,821$	0,999	77,46	-0,19
308,14	579,57	75,05	4,318	3,25E-03			75,01	0,06
318,10	584,65	71,75	4,273	3,14E-03			71,57	0,25
328,52	582,04	68,44	4,226	3,04E-03			68,36	0,12
337,77	582,04	65,64	4,184	2,96E-03			65,78	-0,21
301,65	1009,57	77,41	4,349	3,32E-03	Ln $\epsilon_r = 460,71 * (1/T) + 2,824$	0,999	77,57	-0,20
308,14	1019,15	75,16	4,320	3,25E-03			75,12	0,06
318,10	1014,79	71,85	4,275	3,14E-03			71,68	0,24
328,52	1018,13	68,54	4,227	3,04E-03			68,46	0,11
337,77	1015,38	65,74	4,186	2,96E-03			65,88	-0,22

En la Tabla 25, se observa que la permitividad relativa calculada según cada ecuación de regresión, presenta errores muy bajos, que van de -0,22% a 0,25%, y los coeficientes de determinación son muy cercanos a 1. Además, las pendientes de las ecuaciones de regresión son muy similares, por lo que los gráficos se superponen (Figura 15). De esta forma, podría ser una buena aproximación para determinar la permitividad relativa del agua en estas condiciones de temperatura y presión.

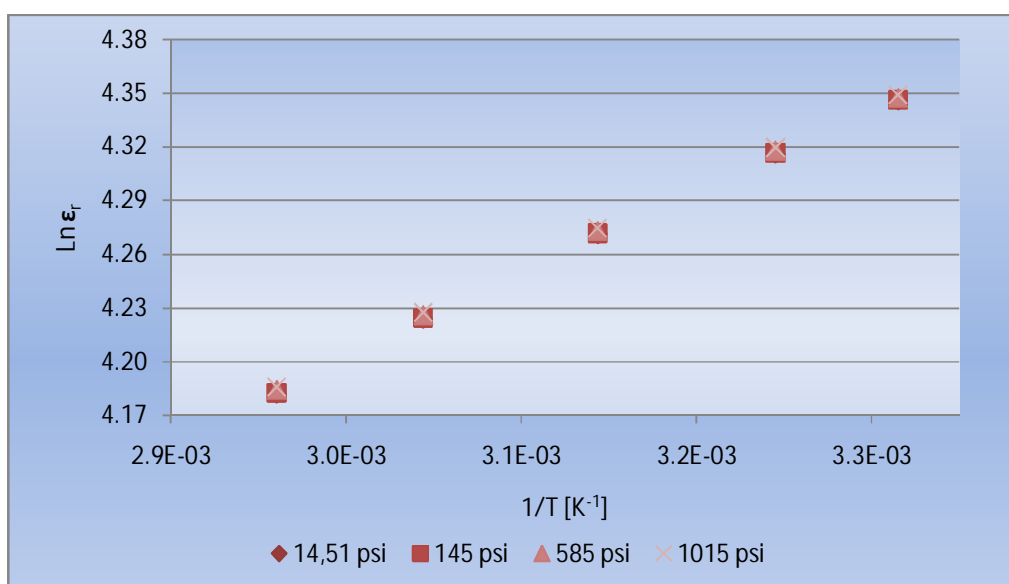


Figura 15 – Gráfico Ln ε_r vs 1/T, a distintas presiones

En condiciones cercanas a las críticas, la presión tiene una gran influencia sobre la permitividad relativa, ya que el estado físico en el que se encuentra, supone características intermedias entre un gas y un líquido. La determinación experimental de la permitividad relativa en el punto crítico, puede ser

extremadamente difícil, debido a la compresibilidad infinita del fluido (Marshall, 2008).

En regiones cercanas al punto crítico, la permitividad relativa es función de la densidad y de la temperatura (Marshall, 2008). En este sentido, el modelo utilizado, no sirve para predecir la permitividad relativa en condiciones de fluido sobrecalentado, crítico o supercrítico.

El tercer modelo propuesto, relaciona el logaritmo de $(\epsilon_r - 1)$ con el logaritmo de la densidad del fluido en estudio. Marshall, calculó por este método la permitividad relativa del agua en el punto crítico (374°C, 0.322 g/cm³, 22.2 MPa), obteniendo $\epsilon_r = 5.73$.

Para la estimación de la permitividad relativa de la acetona, en condiciones de fluido sobrecalentado, se requiere determinar su densidad. Incluso si no hay datos disponibles, existen varias técnicas para determinar la densidad de líquidos puros.

Uno de los modelos más utilizados, es el de Yen-Woods (Reid y col., 1977), que es una correlación general, aplicable tanto a líquidos saturados como comprimidos. Ha sido probado en materiales puros, tanto polares, como no polares. Este modelo correlaciona la densidad molar del líquido saturado, ρ_s ; la densidad crítica, ρ_c ; y la temperatura reducida del sistema, T_r , que es el cociente entre la temperatura del sistema y la temperatura crítica de la acetona (508,25 K):

$$\rho_s/\rho_c = 1 + \sum_{j=1}^4 K_j \cdot (1 - T_r)^{j/3}$$

Donde

$$K_1 = 17,4425 - 214,578 \cdot Z_c + 989,625 \cdot Z_c^2 - 1522,05 \cdot Z_c^3$$
$$K_2 = -3,28257 + 13,6377 \cdot Z_c + 1074844 \cdot Z_c^2 - 384,211 \cdot Z_c^3$$

(Si $Z_c \leq 0,26$)

$$K_3 = 0$$
$$K_4 = 0,93 - K_2$$

Z_c es el factor de compresibilidad crítico, que en el caso de la acetona es 0,233 (Xiang, 2005). Reemplazando este valor, obtenemos que $K_1=1,9185$; $K_2=0,87$; $K_3=0$; y $K_4=0,060$.

Una vez que se tiene la relación ρ_s/ρ_c , se puede determinar el volumen molar de líquido saturado, V , de la siguiente forma:

$$V = \frac{V_c}{\rho_s/\rho_c}$$

Donde V_c es el volumen crítico, que en el caso de la acetona es $209 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (Xiang, 2005). Con el volumen molar, se puede determinar la densidad,

$$\rho = M/V$$

Donde M es el peso molecular de la acetona, $58,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

En la Tabla 26, se entrega la densidad calculada para la acetona, según el modelo de Yen-Woods, necesaria para correlacionar $\text{Log}(\epsilon_r - 1)$ y $\text{Log} \rho$. Además, se entregan las permitividades relativas calculadas con esta ecuación, observándose un porcentaje de error ($\% \epsilon_r$) que va desde -3,45% a 2,69%.

El modelo tiene siguiente ecuación:

$$\log(\varepsilon_r - 1) = 3,991 \cdot \log \rho + 1,652$$

Y presenta un coeficiente de determinación de 0,885.

De esta forma, se podría calcular la densidad y la permitividad relativa para la acetona, en las condiciones óptimas de extracción utilizadas,

Temperatura: 402,15 K

Presión: 1650 psi

Densidad calculada: 0,681 g·cm⁻³

Permitividad relativa: 10,68

Así, queda demostrado que la permitividad relativa de la acetona, en las condiciones de extracción, baja considerablemente, desde 20,56 hasta 10,68. Si bien este valor se aleja del valor correspondiente al hexano (1,88), como consecuencia de esta disminución en la permitividad relativa de la acetona, la polaridad de este disolvente en las condiciones de extracción es menor a la del disolvente en condiciones normales de presión y temperatura.

Tabla 26 – Permitividad relativa de acetona, a distintas presiones y temperaturas.
 Cálculo de la permitividad relativa (Marshall, 2008), y densidad según el modelo de Yen-Woods (Reid, 1977)
 ((a) Khimenko y col, 1982; (b) Khimenko y col., 1973; (c) Joerges y col., 1950; (d) Pimenova y col., 1984; (e) Goss, 1940;
 (f) Schadow y col., 1969)

T [K]	P [psi]	Temperatura Reducida T_r	ρ_s/ρ_c Calculada	Volumen molar de líquido saturado [cm ³ ·g·mol ⁻¹]	ρ Calculada [g·cm ⁻³]	Permitividad Relativa ϵ_r	Log ($\epsilon_r - 1$)	Log ρ	ϵ_r Calculada	% ϵ_r
278,15 ^(a)	14,70	0,547	3,01	69,50	0,835	22,53	1,333	-0,078	22,86	1,45
283,15 ^(a)	14,70	0,557	2,99	69,94	0,830	21,98	1,322	-0,081	22,32	1,53
288,15 ^(a)	14,70	0,567	2,97	70,39	0,825	21,44	1,311	-0,084	21,78	1,58
288,15 ^(b)	14,70	0,567	2,97	70,39	0,825	22,31	1,329	-0,084	21,78	-2,38
293,15 ^(c)	14,70	0,577	2,95	70,85	0,819	21,80	1,318	-0,087	21,25	-2,54
293,15 ^(e)	14,70	0,577	2,95	70,85	0,819	20,96	1,300	-0,087	21,25	1,37
293,15 ^(b)	14,70	0,577	2,95	70,85	0,819	21,83	1,319	-0,087	21,25	-2,67
293,15 ^(a)	14,70	0,577	2,95	70,85	0,819	20,89	1,299	-0,087	21,25	1,71
298,15 ^(d)	14,70	0,587	2,93	71,32	0,814	21,46	1,311	-0,089	20,72	-3,45
298,15 ^(a)	14,70	0,587	2,93	71,32	0,814	20,34	1,287	-0,089	20,72	1,86
298,15 ^(b)	14,70	0,587	2,93	71,32	0,814	21,23	1,306	-0,089	20,72	-2,41
303,15 ^(b)	14,70	0,596	2,91	71,80	0,808	20,79	1,297	-0,092	20,20	-2,86
303,15 ^(a)	14,70	0,596	2,91	71,80	0,808	19,80	1,274	-0,092	20,20	2,00
303,15 ^(f)	14,23	0,596	2,91	71,80	0,808	20,20	1,283	-0,092	20,20	-0,02
308,15 ^(a)	14,70	0,606	2,89	72,30	0,803	19,25	1,261	-0,095	19,68	2,21
308,15 ^(b)	14,70	0,606	2,89	72,30	0,803	19,82	1,275	-0,095	19,68	-0,73
313,15 ^(c)	14,70	0,616	2,87	72,81	0,797	18,71	1,248	-0,098	19,16	2,41
318,15 ^(b)	14,70	0,626	2,85	73,33	0,791	19,30	1,263	-0,102	18,65	-3,37
318,15 ^(a)	14,70	0,626	2,85	73,33	0,791	18,16	1,235	-0,102	18,65	2,69
323,15 ^(b)	14,70	0,636	2,83	73,87	0,786	18,18	1,235	-0,105	18,14	-0,21

V.6. Optimización de variables de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido

De manera análoga al proceso de optimización de extracción con disolventes en batch, se seleccionaron variables inherentes al rango de trabajo del equipo utilizado, considerando además, que estuvieran dentro del rango de trabajo del equipo ASE, de forma de hacer más comparable el proceso de extracción entre ambas metodologías:

Tiempo Estático:	5 – 60 min
Tiempo Dinámico:	5 – 60 min
Flujo:	1 – 5 mL/min

Las variables de trabajo que se fijaron arbitrariamente, fueron:

Volumen de celda:	2,5 mL (dado por la columna de HPLC utilizada)
Cantidad de muestra:	0,3 g
Presión de trabajo:	1800 ± 50 psi

Si bien la presión de trabajo es un parámetro optimizable en este equipo, se trabajó en el rango especificado, dada la complejidad de obtener presiones de trabajo estables y fijas en la configuración del equipo.

V.6.1. Optimización de variables de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, utilizando un horno como fuente de energía externa

Como fuente de energía externa, se utilizó un horno, que mantiene la temperatura constante de la celda de extracción, el disolvente de extracción, y la muestra propiamente tal.

El rango de trabajo de este horno, para hacer el sistema comparable a la extracción con disolventes en batch, fue:

Temperatura: 40 – 200 °C

Para la optimización, se utilizó un “Diseño central compuesto circunscrito” (CCD), que consideró cuatro variables (Temperatura, Tiempo estático, Tiempo dinámico, Flujo):

$$2^N + 2 \cdot N + C(N)$$

Donde **N:** Número de factores experimentales

C: Número de puntos centrales

De esta forma, el número de experimentos estaría dado por:

$$2^4 + 2 \cdot 4 + 3$$

Así, se realizaron 27 experimentos, en un bloque. La matriz codificada de experimentos se muestra en la Tabla 27:

Tabla 27 – Matriz de optimización codificada

Experimento	Temperatura	Tiempo Estático	Tiempo Dinámico	Flujo
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

En la Tabla 28, se observa la matriz de optimización en valores naturales:

Tabla 28 – Matriz de optimización en valores naturales

Experimento	Temperatura	Tiempo Estático	Tiempo Dinámico	Flujo
1	80	19	19	2
2	160	19	19	2
3	80	46	19	2
4	160	46	19	2
5	80	19	46	2
6	160	19	46	2
7	80	46	46	2
8	160	46	46	2
9	80	19	19	4
10	160	19	19	4
11	80	46	19	4
12	160	46	19	4
13	80	19	46	4
14	160	19	46	4
15	80	46	46	4
16	160	46	46	4
17	40	33	33	3
18	200	33	33	3
19	120	5	33	3
20	120	60	33	3
21	120	33	5	3
22	120	33	60	3
23	120	33	33	1
24	120	33	33	5
25	120	33	33	3
26	120	33	33	3
27	120	33	33	3

Una vez realizados los experimentos, se obtuvieron los siguientes resultados

(Tabla 29):

Tabla 29 – Matriz de resultados, método de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido

Experimento	4-t-OP	4-NP	4-n-OP	4-OPE	4-NPE
	[mg·kg ⁻¹]				
1	2,15	167,07	7,00	2,52	84,54
2	1,54	150,70	4,99	1,67	65,70
3	1,26	156,79	4,52	1,03	52,31
4	1,12	166,63	5,31	1,72	50,83
5	1,06	142,38	4,12	0,89	104,98
6	1,20	179,62	4,99	1,08	120,89
7	1,14	168,59	4,74	0,85	76,41
8	1,17	170,81	4,96	1,44	107,67
9	0,85	165,60	4,27	0,72	245,58
10	0,71	129,02	3,50	0,77	104,63
11	7,58	286,87	25,64	14,71	450,31
12	1,89	105,94	8,76	6,39	258,58
13	1,39	24,70	6,24	4,89	68,23
14	1,13	31,52	5,57	4,29	86,47
15	1,39	81,88	6,40	4,17	177,68
16	1,65	139,52	7,58	4,46	284,88
17	1,24	76,19	5,86	3,81	83,81
18	1,58	139,16	7,62	6,04	367,69
19	1,66	143,06	7,58	4,30	404,20
20	1,34	101,04	6,46	3,75	106,08
21	1,64	145,19	7,54	3,70	101,92
22	1,68	149,84	7,63	4,11	345,46
23	1,76	164,29	8,23	4,15	393,09
24	1,40	116,15	6,84	3,52	103,20
25	1,30	94,60	6,48	3,99	253,70
26	1,19	77,34	5,91	3,79	184,76
27	1,56	134,85	7,59	3,68	123,72

En la Figura 16, se presentan los gráficos de Pareto estandarizados para cada uno de los analitos en estudio:

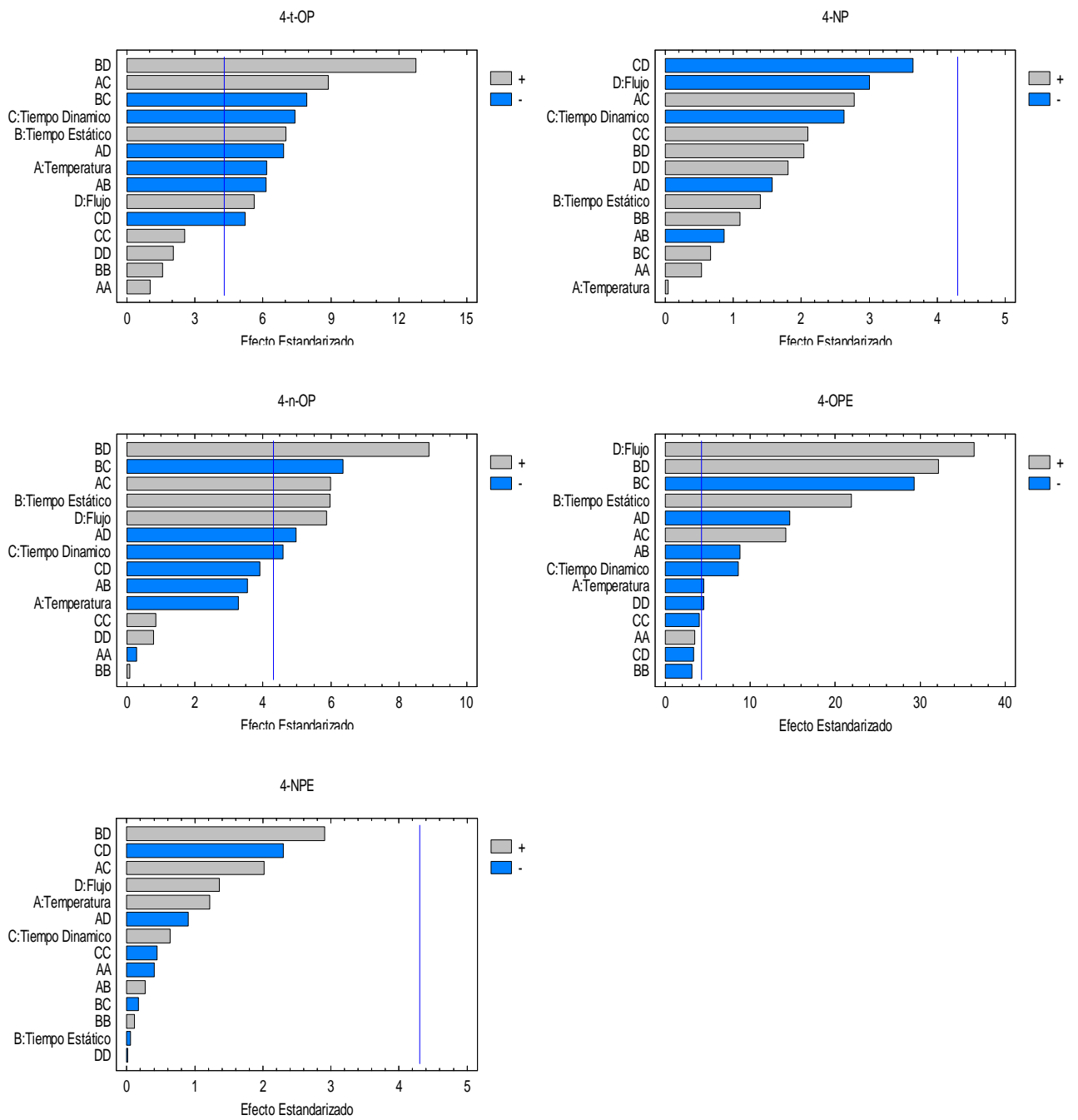


Figura 16 – Gráficos de Pareto estandarizados para cada uno de los analitos

Se observa que la temperatura, resultó significativa sólo en el caso de 4-t-OP y 4-OPE. Cuando la temperatura de extracción se eleva, la extractabilidad de estos compuestos disminuye, debido a que ejerce una influencia negativa en su extracción.

El tiempo estático de extracción fue significativo en 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. Esta influencia fue observada en la extracción en batch, tanto en mezclas Acet/DCM, como en mezclas Acet/Hex. En la medida que aumentó el tiempo estático en que se realizó la extracción, la extracción de estos compuestos fue mayor.

El tiempo dinámico de extracción fue significativo en los mismos compuestos que el tiempo estático, pero ejerciendo una influencia contraria al tiempo estático. De esta forma, cuando aumentó el tiempo dinámico de extracción, la recuperación de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE fue menor.

El flujo de disolvente utilizado durante el proceso de extracción fue significativo en el mismo grupo de compuestos. En la medida que el flujo aumentó, la extracción de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE fue mayor.

Las interacciones entre variables, tienen un comportamiento particular para cada compuesto: para la interacción entre la temperatura y el tiempo estático, fue significativa en los compuestos 4-t-OP y 4-OPE. Se observó que las siguientes interacciones: entre la temperatura y el tiempo dinámico, entre la temperatura y el flujo, entre el tiempo estático y el tiempo dinámico, entre el tiempo estático y el flujo, fueron significativas en 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. Por último, la interacción entre el tiempo dinámico y el flujo, fue significativa sólo en el caso de 4-t-OP.

El resumen de la significancia estadística de cada una de las variables con respecto a cada uno de los compuestos en estudio se encuentra en la Tabla 31:

Tabla 30 – Resumen de significancia estadística: A: Temperatura; B: Tiempo Estático; C: Tiempo Dinámico; D: Flujo; (+) Interacción Positiva; (-) Interacción Negativa; (NS) No Significativa

Analito	A	B	C	D	AA	BB	CC	DD	AB	AC	AD	BC	BD	CD
4-t-OP	-	+	-	+	NS	NS	NS	NS	-	+	-	-	+	-
4-NP	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4-n-OP	NS	+	-	+	NS	NS	NS	NS	NS	+	-	-	+	NS
4-OPE	-	+	-	+	NS	NS	NS	-	-	+	-	-	+	NS
4-NPE	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

El análisis de varianza, entrega los parámetros de coeficiente de determinación (R^2), y carencia de ajuste, para cada uno de los analitos (Tabla 31):

Tabla 31 – Valores de R^2 y carencia de ajuste para cada analito

Analito	R^2 [%]	Carencia de Ajuste (P-Value)
4-t-OP	54,70	0,0200
4-NP	66,64	0,3255
4-n-OP	54,86	0,0384
4-OPE	54,03	0,0027
4-NPE	24,48	0,1339

Dado que el p-value para la carencia de ajuste es menor a 0,05, existe una carencia de ajuste estadísticamente significativa, a un 95% de confianza, por lo

que el modelo de ajuste puede no representar adecuadamente los datos en el caso de 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE. A pesar de esto, el coeficiente de determinación da cuenta de un ajuste superior al 50% en todos los compuestos, con excepción del 4-NPE, que se encuentra en mayor concentración.

Los valores óptimos predichos para cada variable, por analito, se muestran en la Tabla 32:

Tabla 32 – Valores óptimos de cada variable de los compuestos

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Tiempo Dinámico		Flujo	
	Valor Codif.	Valor natural [°C]	Valor Codif.	Valor natural [min]	Valor Codif.	Valor natural [min]	Valor Codif.	Valor natural [mL·min ⁻¹]
4-t-OP	-2,0	40	1,88	58	-2,0	5	1,99	5
4-NP	-2,0	40	1,99	60	-1,98	5	1,99	5
4-n-OP	-1,84	46	1,74	57	-2,00	5	2,00	5
4-OPE	-1,97	41	2,00	60	-1,99	5	1,70	5
4-NPE	1,72	189	-1,99	5	2,00	60	-2,00	1

Se observa que los valores óptimos para cada variable son similares a la mayoría de los compuestos, con excepción del 4-NPE, cuyos valores óptimos de cada variable corresponden al extremo opuesto del rango utilizado para la optimización del método. De esta forma, tenemos que la temperatura, debe mantenerse baja (~40°C), para 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP y 4-OPE, mientras que en el caso del 4-NPE, la temperatura de extracción debe ser casi cinco veces más alta.

En el caso del tiempo estático, se recomienda un valor cercano a los 60 minutos en 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP y 4-OPE, mientras que en el caso del 4-NPE, se recomienda un tiempo estático de cinco minutos. Por el contrario, el tiempo dinámico recomendado en 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP y 4-OPE es de cinco minutos, comparado con el recomendado para 4-NPE, que requiere un tiempo dinámico de extracción de 60 min.

Por último, el flujo recomendado en 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP y 4-OPE es bastante alto (5 mL/min), en contraposición con el caso del 4-NPE, que es bastante bajo (1 mL/min).

De esta forma, los compuestos 4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP y 4-OPE son susceptibles de ser extraídos a una baja temperatura, mayor tiempo estático, bajo tiempo dinámico y alto flujo, por lo que serían más afines con la extracción en modo batch. Por el contrario, el compuesto 4-NPE requiere una alta temperatura, bajo tiempo estático, mayor tiempo dinámico y bajo flujo, por lo que sería más fácil de extraer por un sistema que opere en modo continuo preferentemente.

Dado que se requiere encontrar las condiciones de extracción óptimas para todos los compuestos en estudio, se procedió a agrupar los analitos totalmente, para determinar la función de deseabilidad de Derringer (D), que nos entrega una condición de compromiso óptima entre las respuestas de cada compuesto.

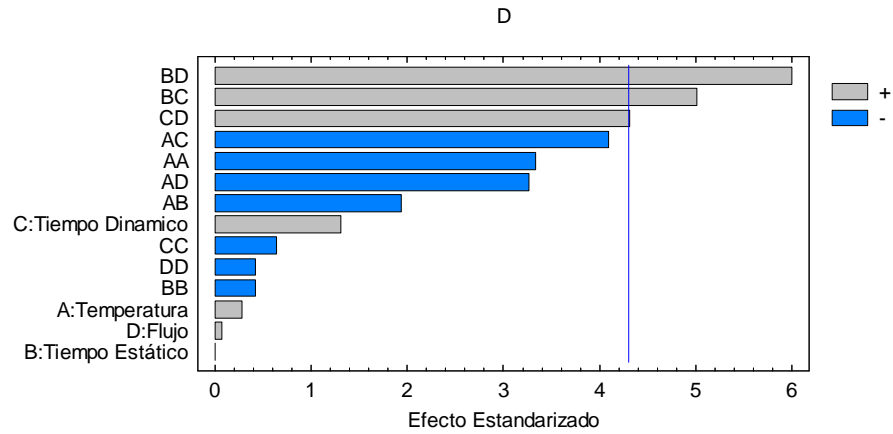


Figura 17 – Gráfico de Pareto estandarizado para la función de deseabilidad de Derringer (D)

Al agrupar los compuestos en la función D, todas las variables de extracción dejan de ser significativas. Toman importancia las siguientes interacciones: entre el tiempo estático y el flujo, entre el tiempo estático y el tiempo dinámico, y entre el tiempo dinámico y el flujo.

En la Figura 18, se presenta la superficie de respuesta estimada para D:

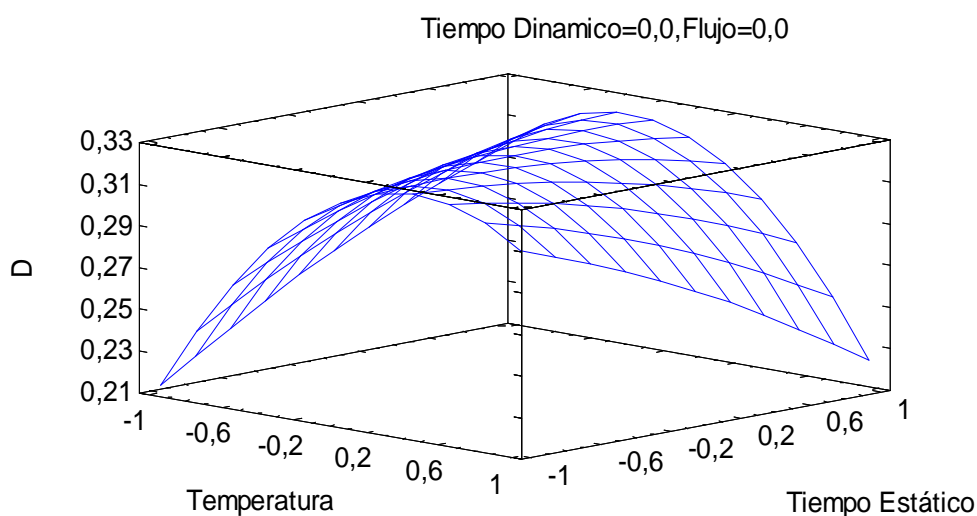


Figura 18 – Superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad de Derringer (D)

Se puede observar, que en la medida que aumenta la temperatura, se llega a un valor óptimo, que está cercano a la mitad del intervalo. Por el contrario, en la medida que el tiempo estático disminuye, se obtiene un valor óptimo.

Se obtuvo la siguiente ecuación para el modelo:

$$D = 0,3235 + 0,0053 \cdot T + 0,0001 \cdot TE + 0,00260 \cdot TD + 0,00147 \cdot F - 0,05548 \cdot T^2 - 0,04214 \cdot T \cdot TE - 0,1023 \cdot T \cdot TD - 0,08149 \cdot T \cdot F - 0,00700 \cdot TE^2 + 0,12510 \cdot TE \cdot TD + 0,14981 \cdot TE \cdot F - 0,01075 \cdot TD^2 + 0,11502 \cdot TD \cdot F - 0,00702 \cdot F^2$$

Donde **T**: Temperatura; **TE**: Tiempo Estático; **TD**: Tiempo Dinámico; **F**: Flujo

Este modelo presenta un coeficiente de determinación (R^2) de 85,89%. Debido a que sólo las interacciones entre el tiempo estático y el flujo, entre el tiempo estático y el tiempo dinámico, y entre el tiempo dinámico y el flujo, tienen significancia estadística, la ecuación del modelo se puede reducir a:

$$D = 0,3235 + 0,12510 \cdot TE \cdot TD + 0,14981 \cdot TE \cdot F + 0,11502 \cdot TD \cdot F$$

Los valores óptimos predichos para cada variable, al agrupar a los compuestos en la función de deseabilidad, se muestran en la Tabla 33:

Tabla 33 – Valores óptimos de cada variable, para todos los compuestos agrupados

Analito	Temperatura		Tiempo Estático		Tiempo Dinámico		Flujo	
	Valor Codif.	Valor natural [°C]	Valor Codif.	Valor natural [min]	Valor Codif.	Valor natural [min]	Valor Codif.	Valor natural [mL/min]
Todos	-1,91883	43	1,99482	60	2,0	60	2,0	5

Se realizó la extracción de los compuestos en las condiciones óptimas predichas por el modelo (Tabla 34):

Tabla 34 – Extracción por método de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido en condiciones óptimas

Analito	Promedio [mg·kg⁻¹]	DE [mg·kg⁻¹]
4-t-OP	4,45	1,61
4-NP	236,48	59,05
4-n-OP	12,32	4,54
4-OPE	5,78	2,73
4-NPE	225,53	94,91

La extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, utilizando un horno como fuente externa de energía, no extrae de forma tan cuantitativa como la extracción con disolventes presurizados en batch.

V.6.2. Optimización de variables de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, utilizando ultrasonido como fuente de energía externa

Debido a que la extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, utilizando un horno como fuente de energía externa, fue menos eficiente que la extracción con disolventes presurizados en modo batch, se optó por tanto, reemplazar la fuente de energía externa por ultrasonido. Las condiciones experimentales son las siguientes:

- Temperatura:** 70°C
- Tiempo Estático:** 30 min
- Tiempo Dinámico:** 10 min
- Flujo:** 4 mL·min⁻¹

El ultrasonido se aplicó durante el tiempo estático, en intervalos de 0, 5, 10, 20 y 30 min. Cada extracción se hizo en duplicado.

Los resultados de las extracciones se muestran en la Tabla 35:

Tabla 35 – Extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, utilizando ultrasonido como fuente de energía externa

Analito	Tiempo de Ultrasonido									
	0 Min		5 Min		10 min		20 min		30 min	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
4-t-OP	1,68	0	1,54	0,02	1,54	0,01	1,61	0,05	1,45	0,07
4-NP	169,34	25,47	165,56	44,87	199,30	8,61	215,95	1,54	199,33	6,92
4-n-OP	6,45	0	6,00	0,04	6,00	0,11	6,39	0,03	6,00	0,17
4-OPE	2,50	0	1,76	0,07	2,02	0,10	1,66	0,04	1,56	0,14
4-NPE	114,84	2,62	105,94	12,01	299,72	1,67	206,44	54,49	191,30	49,27

En las Figuras 19 y 20, se observan las extracciones realizadas a distintos tiempos de aplicación de ultrasonido:

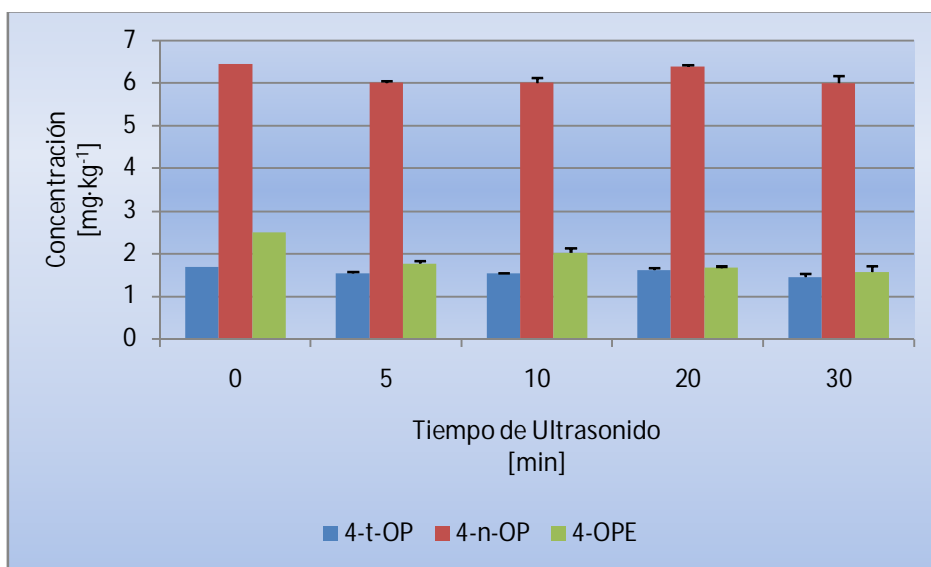


Figura 19 – Comparación de extracción a distintos tiempos de ultrasonido, para los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE

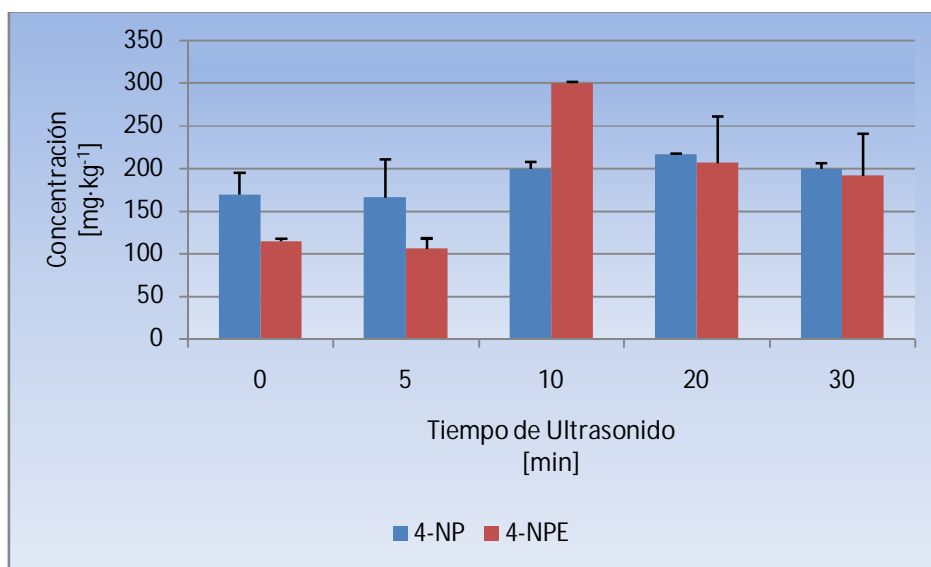


Figura 20 – Comparación de extracción a distintos tiempos de ultrasonido, para los compuestos 4-NP y 4-NPE

Se observa que en el grupo de compuestos de menor concentración (4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE), la extracción no varía considerablemente al cambiar el tiempo de aplicación de ultrasonido. Sin embargo, su extracción fue cuantitativa en ausencia de este último.

En el caso de 4-NP y 4-NPE, fueron cuantitativamente extraídos respectivamente a los 20 y 10 minutos de aplicación de ultrasonido.

En virtud de lo anterior, considerando que la extracción desde la matriz debe ser cuantitativa para todos los analitos en estudio, la aplicación de 10 minutos de ultrasonido sería la adecuada, para una mejor extracción de todos los compuestos. En las Figuras 21 y 22, se presentan los resultados de la extracción de los compuestos en estudio, en los distintos métodos de extracción optimizados:

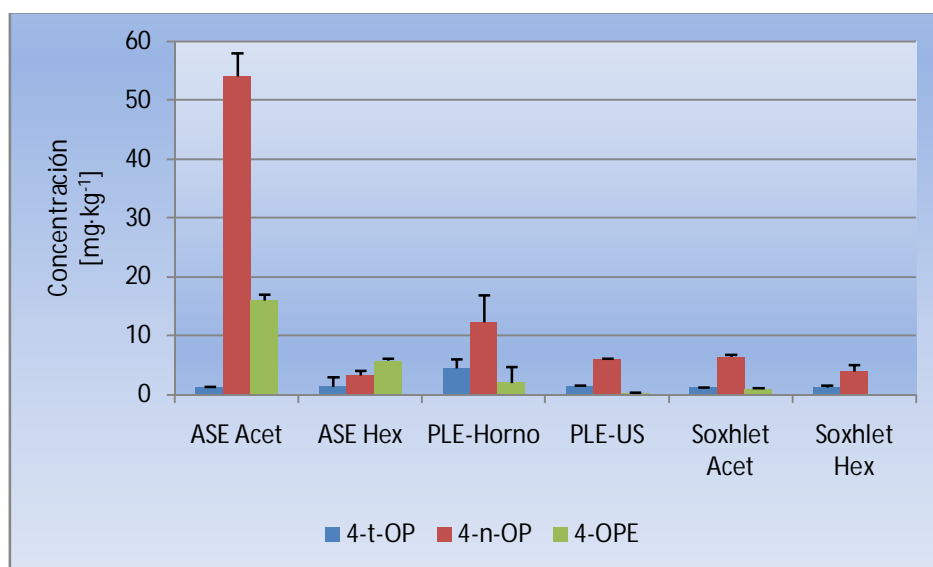


Figura 21 – Comparación de la extracción de los compuestos 4-t-OP, 4-n-OP y 4-NPE a través de distintos métodos optimizados

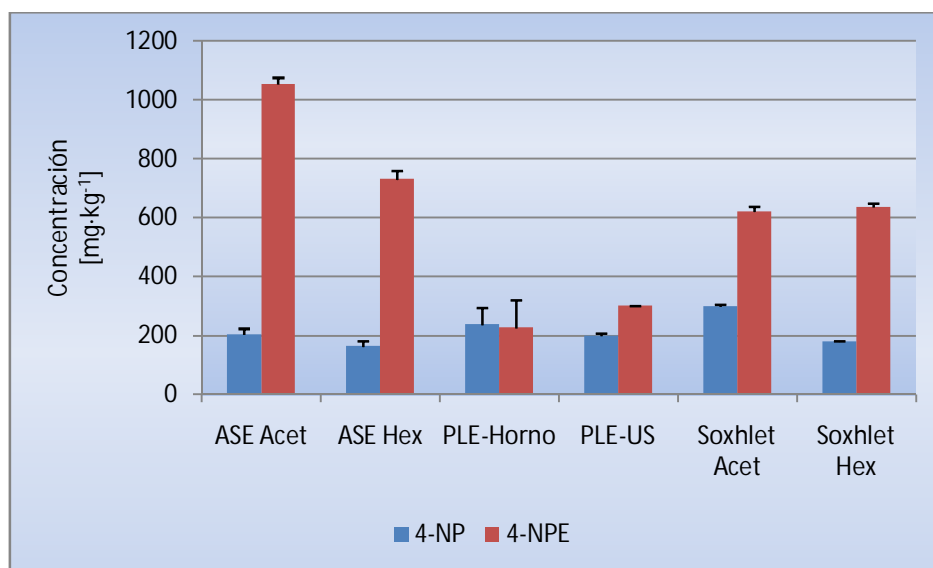


Figura 22 – Comparación de la extracción de los compuestos 4-NP y 4-NPE a través de distintos métodos optimizados

A pesar de las optimizaciones realizadas en el sistema de extracción con disolventes presurizados en modo híbrido, ya sea utilizando como fuente de energía externa un horno o ultrasonido, el método que presentó una mejor capacidad de extracción para la mayoría de los compuestos corresponde a la extracción con disolventes presurizados en batch, utilizando acetona como disolvente de extracción. La extracción Soxhlet, utilizando acetona o hexano como disolvente de extracción, fue comparable a la extracción en modo híbrido cuya configuración incluyó ultrasonido como fuente de energía externa, e inferior a este mismo método de extracción, cuando su configuración incluyó un horno como fuente de energía externa, en los compuestos en menor concentración (4-t-OP, 4-n-OP y 4-OPE). En los compuestos que se encontraban en mayor concentración (4-NP y 4-NPE), lo extraído a través de

la extracción Soxhlet fue mayor a lo extraído con disolventes presurizados en modo híbrido.

Considerando lo anterior, en los estudios de aplicación ambiental se utilizó la extracción con disolventes presurizados en batch optimizada anteriormente.

V.7. Influencia de la aplicación de biosólido en la movilidad y biodisponibilidad de alquilfenoles (4-NP y 4-NPE) en suelo

El suelo agrícola utilizado, Chada, fue muestreado a 6253,4 Km Lat UTM y 348,8 Km UTM, de orden Mollisol y Textura Franco Limoso. En la Tabla 36, se presentan las propiedades químicas determinadas tanto en el suelo agrícola utilizado como en el biosólido:

Tabla 36 – Caracterización de suelo y biosólido

Determinación	Unidad	Suelo Chada	Biosólido
pH-H ₂ O (1:2,5)	–	7,83	7,09
CE (extracto de saturación)	dS/m	2,21	14,1
MO total (calcinación 450 °C)	%	5,46	53,6
MO oxidable	%	4,57	35,0
N Total	g/kg	2,56	42,3
P Total	g/kg	1,71	30,8
K Total	g/kg	3,87	1,66

El pH del suelo fue más alto que el pH del biosólido.

Los valores de conductividad eléctrica (CE) mostrados en la Tabla 36, muestran un valor mucho mayor para el biosólido con respecto al suelo, indicando un contenido de sales mayor, lo cual es coherente con lo encontrado generalmente en estas muestras. En este mismo sentido es posible observar que el contenido de materia orgánica es más alto para el biosólido, lo que concuerda con las características que hacen del biosólido una buena alternativa como enmienda orgánica por el alto contenido de micro y macro nutrientes que contiene. La materia orgánica afecta el crecimiento y rendimiento del cultivo, ya sea directamente por el suministro de nutrientes o indirectamente mediante la modificación de las propiedades físicas del suelo tales como la estabilidad de los agregados y la porosidad, que pueden mejorar el entorno de la raíz y estimular el crecimiento de plantas (Darwish et al., 1995).

En el caso del biosólido utilizado, las cantidades de N, P y K, son de 4,23%, 3,08% y 0,17%, respectivamente. Se ha demostrado que la excesiva fertilización con fosfato sintetizado químicamente, han causado acumulación de compuestos de fosfatos insolubles, que gradualmente deterioran la calidad y el pH del suelo (Omar, 1998). La aplicación de tasas apropiadas de fertilizantes de N, P y K, han reportado un incremento en la disponibilidad de Cu, Zn y Mn, en el suelo (Li, y al., 2007). También se ha reportado que altas tasas de fertilizantes, suprimen la respiración microbiana (Thirukkumaran y Parkinson, 2000). Si bien el biosólido utilizado no tiene concentraciones muy altas de estos elementos esenciales para las plantas, constituyen una opción viable a la hora de fertilizar un suelo agrícola.

Por otra parte, se determinó el contenido total de 4-NP y 4-NPE en las muestras de suelo Chada (S) y biosólido (B) (Tabla 37):

Tabla 37 – Concentración total de 4-NP y 4-NPE en muestras de suelo y biosólido (n=2)

Muestra	4-NP		4-NPE	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
S	0,9	0,4	0,8	0,4
B	327	49	963	44

El biosólido además fue enriquecido con 1500 mg·kg⁻¹ de nonilfenol técnico, obteniendo un biosólido enriquecido (BE) con una concentración total para este analito de: **BE: 2688 ± 333 mg·kg⁻¹ de 4-NP**

La concentración final del biosólido enriquecido con 4-NP es mayor que la concentración máxima de 4-NP encontrada normalmente en biosólidos, cercana a los 1500 mg·kg⁻¹ (Brown y col. 2009), sin embargo representa un escenario posible dependiendo del tipo y procedencia del biosólido. Por otra parte, se utilizó esta concentración alta de 4-NP, en comparación con el biosólido sin enriquecer, para observar claramente la eventual asimilación de este compuesto por las plantas, y si existe movilidad del compuesto en el suelo.

V.7.1. Estudio de movilidad

La movilidad de un compuesto en el agua indica su grado de solubilidad en agua, y su adsorción (K_{oc}). Cuando un compuesto se introduce en el suelo, puede interaccionar con los componentes del suelo, especialmente con la materia orgánica, a través de mecanismos de adsorción o sorción, mientras que otra parte de estos

compuestos puede quedar formando parte de la solución del suelo. Estos compuestos que están en la solución del suelo, tienden a desplazarse con el agua y lixiviar a través del perfil de suelo, pudiendo alcanzar las capas más profundas, pero durante esta etapa de transporte pueden interaccionar con los distintos componentes del suelo, limitando de esta forma, su llegada al nivel freático. Por tanto, la solubilidad de un compuesto y su adsorción en el suelo están inversamente relacionadas: esto quiere decir que un aumento de la solubilidad, se traduce en un descenso de la adsorción (FAO, 2000).

El coeficiente de partición K_{oc} se define como la razón entre la concentración de compuesto adsorbido en la fracción orgánica de fase sólida del suelo y la concentración de éste en la fase solución del mismo. Así, para una cantidad determinada de compuesto, cuanto menor sea el valor de K_{oc} , mayor será su concentración en la solución. Es más probable que se lixivien en las aguas subterráneas los compuestos con un valor bajo de K_{oc} que los que tienen un valor alto. La adsorción de un compuesto determinado será mayor en suelos con un alto contenido de materia orgánica. Por consiguiente, se considera que la lixiviación será más lenta en esos suelos que en los suelos con un contenido inferior de materia orgánica.

Debido a la gran variedad de valores de K_{oc} , se recomienda utilizar el logaritmo de K_{oc} . La movilidad de los compuestos en el suelo se clasifica según se muestra en la Tabla 38:

Tabla 38 – Clasificación de movilidad (FAO, 2000)

Log K_{oc}	Clasificación
< 1	Sumamente móvil
1–2	Móvil
2–3	Moderadamente móvil
3–4	Ligeramente móvil
4–5	Escasamente móvil
> 5	No es móvil

Un compuesto puede presentar valores diferentes de K_{oc} , dependiendo de la matriz en que se encuentre.

Se han reportado valores de Log K_{oc} para nonilfenol en suelos, de 3,96 y 3,97 (Höllrigl-Rosta et al, 2003; During et al., 2002), por lo tanto tendría una movilidad ligera. En tanto, para nonilfenol etoxilato en suelos, se han reportado valores de Log K_{oc} de 4,94 y 5,06 (Yu et al., 2008), para etoxilatos con una y dos cadenas alquílicas respectivamente. De esta forma, el 4-NPE tendría una movilidad escasa.

En la Tabla 39, se presentan los resultados de las extracciones del estudio de movilidad de los alquilfenoles:

Tabla 39 – Extracción de fracciones de columnas enmendadas con biosólido y biosólido enriquecido con NP (n=2)

Muestra	4-NP		4-NPE	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
15DB100F1	66	2	73	3
15DB100F3	1,8	0,1	42	1
15DB100F5	2,1	0,01	50	1
15DBE100F1	516	10	73	2
15DBE100F3	22	2	51	7
15DBE100F5	19	3	43	2
15DBE200F1	983	20	104	2
15DBE200F3	25	4	78	3
15DBE200F5	17	3	65	1
30DB100F1	50	3,1	74	2
30DB100F5	2,3	0,1	40	3
30DBE100F1	305	8	72	2
30DBE100F3	24	4	48	1
30DBE200F1	703	15	102	3
30DBE200F5	31	1	66	1
45DB100F1	52	3	72	2
45DB100F3	2,1	0,1	50	1
45DBE100F1	259	11	73	1
45DBE100F3	22	8	50	3
45DBE100F5	16	0,2	42	1
45DBE200F1	450	22	103	7
45DBE200F5	28	3	68	2
60DB100F1	19	3	72	2
60DB100F5	2,2	0,2	42	2
60DBE100F1	154	28	71	1
60DBE100F3	19	2	53	1
60DBE100F5	16	0,1	43	2
60DBE200F1	243	8	108	3
60DBE200F3	33	2	73	3
60DBE200F5	29	1	70	2

Tiempo: 15, 30, 45 y 60 días; B: biosólido natural; BE: biosólido enriquecido con NP; Dosis de biosólido aplicado: 100 y 200 Mg·ha⁻¹; F: fracciones; F1: 0-4 cm; F3: 8-13 cm F5: 16-20 cm; DE: desviación estándar

En la Figura 23, se presenta la relación entre la concentración de 4-NP y 4-NPE con el tiempo de ensayo y la dosis de enmienda aplicada, para la primera fracción:

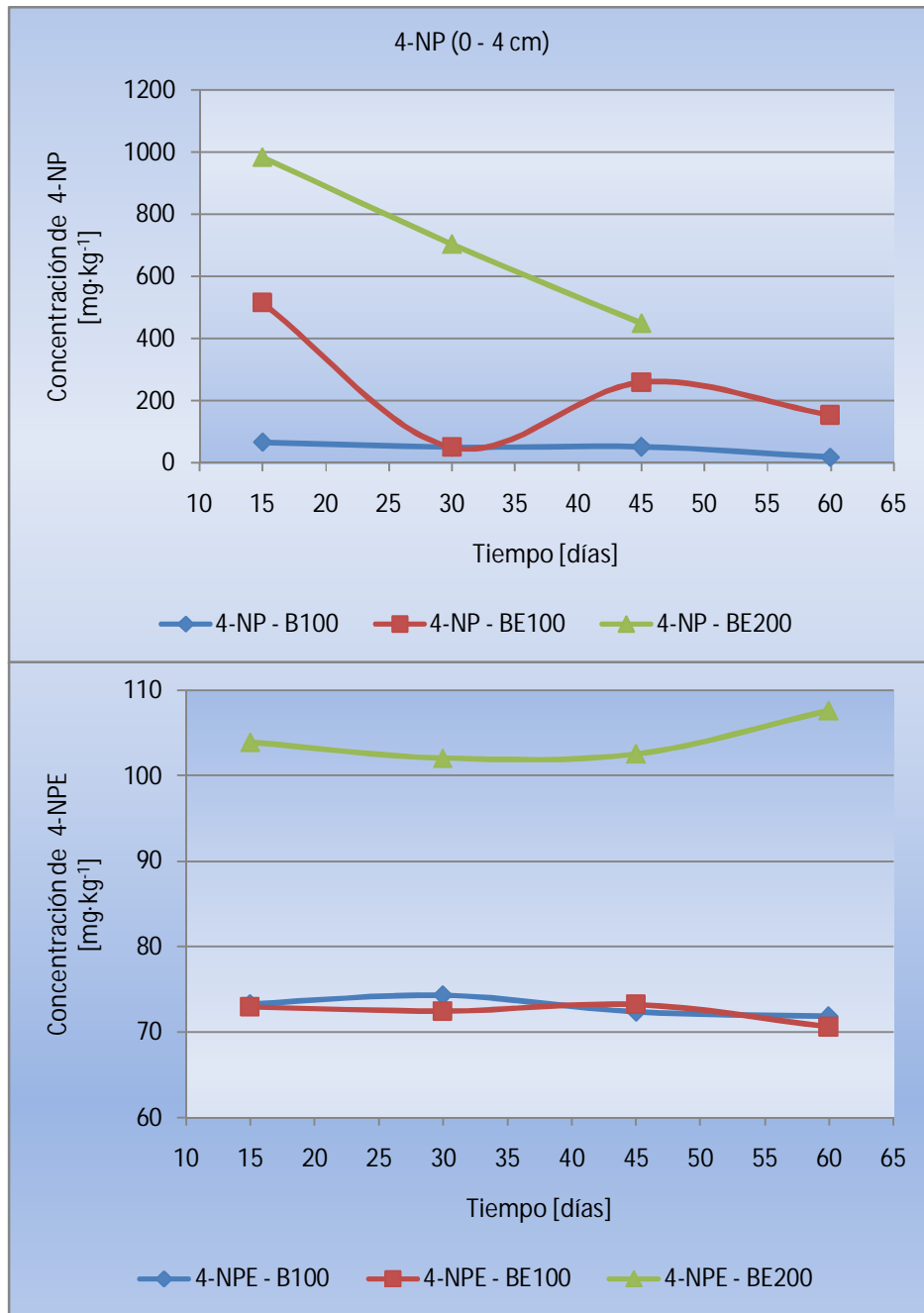


Figura 23 – Concentración de 4-NP y 4-NPE a una profundidad de 0 a 4 cm, en función del tiempo

Se observa para 4-NP, que su concentración en la primera fracción va disminuyendo con el tiempo, lo que ocurre en todos los niveles de enmienda con biosólido. Esto indica claramente que existe migración del compuesto hacia fracciones inferiores de la columna de lixiviación. En el caso de 4-NPE, su concentración permanece relativamente constante en la primera fracción, por lo que hay migración de este compuesto hacia fracciones inferiores, pero no en tal alto grado como en el caso de 4-NP.

Debido a que el análisis de lo que ocurre con estos compuestos considerando las variables tiempo, tipo de biosólido (natural y enriquecido), dosis de enmienda (100 y 200 Mg·ha⁻¹), y profundidad (0-4; 8-13 y 16-20 cm), es dificultoso, se recurrió a su análisis estadístico, a través de un diseño de screening, en un bloque, para observar el comportamiento de estos compuestos. La matriz de experimentos codificada se presenta en la Tabla 40:

Tabla 40 – Matriz de screening codificada

Experimento	Tiempo	Biosólido y Dosis de enmienda	Profundidad
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	1
7	-1	1	-1
8	-1	1	0
9	-1	1	1
10	-0,33	-1	-1
11	-0,33	-1	1
12	-0,33	0	-1
13	-0,33	0	0
14	-0,33	1	-1
15	-0,33	1	1
16	0,33	-1	-1
17	0,33	-1	0
18	0,33	0	-1
19	0,33	0	0
20	0,33	0	1
21	0,33	1	-1
22	0,33	1	1
23	1	-1	-1
24	1	-1	1
25	1	0	-1
26	1	0	0
27	1	0	1
28	1	1	-1
29	1	1	0
30	1	1	1

En la Tabla 41, se presenta la matriz de screening en valores naturales

Tabla 41 – Matriz de screening en valores naturales

Experimento	Tiempo [días]	Biosólido y Dosis de enmienda [Mg·ha⁻¹]	Profundidad [cm]
1	15	B100	0-4
2	15	B100	8-12
3	15	B100	16-20
4	15	BE100	0-4
5	15	BE100	08-12
6	15	BE100	16-20
7	15	BE200	0-4
8	15	BE200	08-12
9	15	BE200	16-20
10	-0,33	B100	0-4
11	-0,33	B100	16-20
12	-0,33	BE100	0-4
13	-0,33	BE100	08-12
14	-0,33	BE200	0-4
15	-0,33	BE200	16-20
16	0,33	B100	0-4
17	0,33	B100	08-12
18	0,33	BE100	0-4
19	0,33	BE100	08-12
20	0,33	BE100	0-4
21	0,33	BE200	0-4
22	0,33	BE200	16-20
23	1	B100	0-4
24	1	B100	16-20
25	1	BE100	0-4
26	1	BE100	08-12
27	1	BE100	16-20
28	1	BE200	0-4
29	1	BE200	08-12
30	1	BE200	16-20

De esta forma, los promedios de las concentraciones de 4-NP y 4-NPE de la Tabla 39, fueron reordenados para hacerlos coincidir con la matriz de screening en valores naturales (Tabla 42):

Tabla 42 – Matriz de screening en valores naturales, incluyendo los resultados de la extracción de 4-NP y 4-NPE

Experimento	Tiempo [días]	Biosólido y		4-NP [mg·kg ⁻¹]	4-NPE [mg·kg ⁻¹]
		Dosis de enmienda [Mg·ha ⁻¹]	Profundidad [cm]		
1	15	B100	0–4	66,37	73,31
2	15	B100	8–12	1,83	41,55
3	15	B100	16–20	2,11	49,71
4	15	BE100	0–4	515,82	72,94
5	15	BE100	08–12	21,96	51,05
6	15	BE100	16–20	18,65	42,45
7	15	BE200	0–4	983,15	103,92
8	15	BE200	08–12	25,03	77,89
9	15	BE200	16–20	17,13	65,37
10	30	B100	0–4	50,07	74,29
11	30	B100	16–20	2,28	39,9
12	30	BE100	0–4	304,96	72,44
13	30	BE100	08–12	23,45	48,02
14	30	BE200	0–4	703,2	102,07
15	30	BE200	16–20	31,19	66,03
16	45	B100	0–4	51,59	72,38
17	45	B100	08–12	2,14	50,21
18	45	BE100	0–4	258,68	73,23
19	45	BE100	08–12	22,37	50,19
20	45	BE100	0–4	16,11	41,92
21	45	BE200	0–4	450,07	102,52
22	45	BE200	16–20	27,68	67,63
23	60	B100	0–4	18,65	71,84
24	60	B100	16–20	2,21	41,5
25	60	BE100	0–4	154,23	70,58
26	60	BE100	08–12	19,15	52,64
27	60	BE100	16–20	15,92	43,37
28	60	BE200	0–4	243,39	107,6
29	60	BE200	08–12	32,77	73,2
30	60	BE200	16–20	29,34	69,7

En la Figura 24, se presentan los gráficos de Pareto para los compuestos 4-NP y 4-NPE. Se observa que en el caso de la movilidad del 4-NP, fueron significativos el

tiempo de ensayo, la dosis de enmienda y la profundidad en la columna de lixiviación, en cambio para 4-NPE, las variables dosis y profundidad fueron significativas.

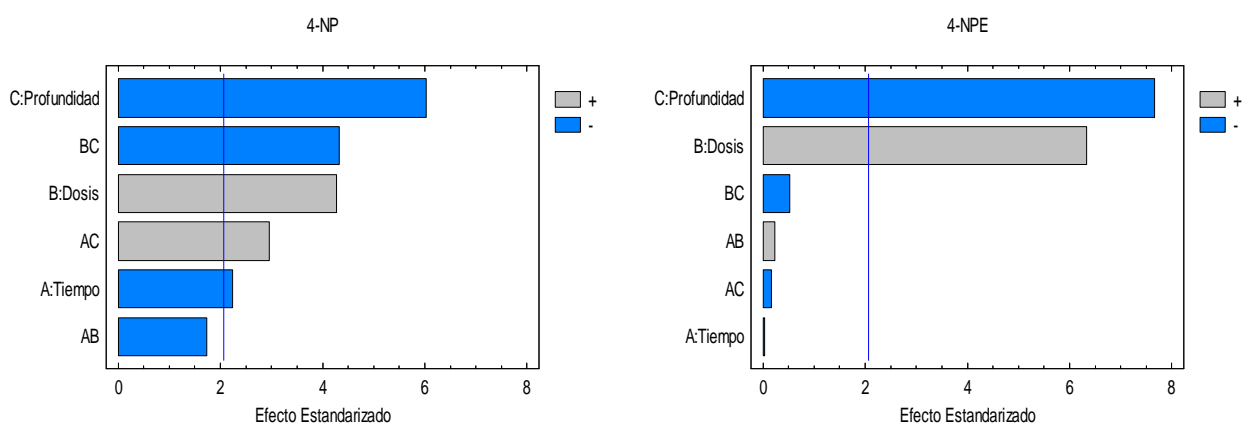


Figura 24 – Gráficos de Pareto estandarizados para 4-NP y 4-NPE extraídos en el ensayo de columnas de lixiviación

El tiempo de ensayo y la profundidad ejercen una influencia negativa, por lo que en la medida que aumentaron, la extracción de 4-NP disminuyó. Por el contrario, la dosis de enmienda ejerce una influencia positiva, por lo que en la medida que esta variable aumentó, la extracción de 4-NP, también se incrementó.

De esta forma el modelo para 4-NP tiene la siguiente ecuación:

$$NP = 128,1 - 61,7 \cdot T + 116,2 \cdot D - 152,1 \cdot P - 59,8 \cdot T \cdot D + 96,2 \cdot T \cdot P - 132,4 \cdot D \cdot P$$

Donde **T**: Tiempo; **D**: Dosis; **P**: Profundidad

En el caso de 4-NPE, se observa que su movilidad estuvo influenciada sólo por la dosis de enmienda aplicada y por la profundidad en la columna de lixiviación. La dosis de enmienda aplicada ejerció una influencia positiva. Por el contrario, la profundidad en la columna de lixiviación, ejerció una influencia negativa. Ambas variables ejercieron la misma influencia que en el caso de 4-NP.

El modelo para 4-NPE, presentó la siguiente ecuación:

$$NPE = 64,1 - 0,07 \cdot T + 14,4 \cdot D - 16,1 \cdot P + 0,65 \cdot T \cdot D - 0,44 \cdot T \cdot P - 1,3 \cdot D \cdot P$$

Los modelos presentan un coeficiente de determinación (R^2) de 80,44% para el 4-NP y de 80,64% para el 4-NPE.

En la Tabla 43, se entrega el resumen de la significancia estadística de cada variable sobre la movilidad de 4-NP y 4-NPE.

Tabla 43 – Resumen de significancia estadística: (+) Interacción Positiva; (-) Interacción Negativa; (NS) No Significativa

Analito	A: Tiempo	B: Dosis de Enmienda	C: Profundidad	AB	AC	BC
4-NP	-	+	-	NS	+	-
4-NPE	NS	+	-	NS	NS	NS

En función de la significancia estadística de las variables para cada compuesto, las ecuaciones de cada modelo pueden simplificarse en:

$$NP = 128,1 - 61,7 \cdot T + 116,2 \cdot D - 152,1 \cdot P + 96,2 \cdot T \cdot P - 132,4 \cdot D \cdot P$$
$$NPE = 64,1 + 14,4 \cdot D - 16,1 \cdot P$$

En las Figuras 25 y 26 se presentan las superficies de respuesta esperadas para 4-NP y 4-NPE.

Se observa que el tiempo de ensayo no tiene gran influencia sobre la cantidad de 4-NP movilizada, cuando la dosis de enmienda aplicada es baja. En cambio, en la medida que la dosis de enmienda aumentó, la cantidad de analito extraído fue mayor. En el caso de 4-NPE, se observa que el tiempo no ejerce una gran influencia sobre la cantidad de analito extraído. La dosis de enmienda, de forma análoga a 4-NP, tiene influencia sobre la cantidad de analito extraído en la medida que aumenta.

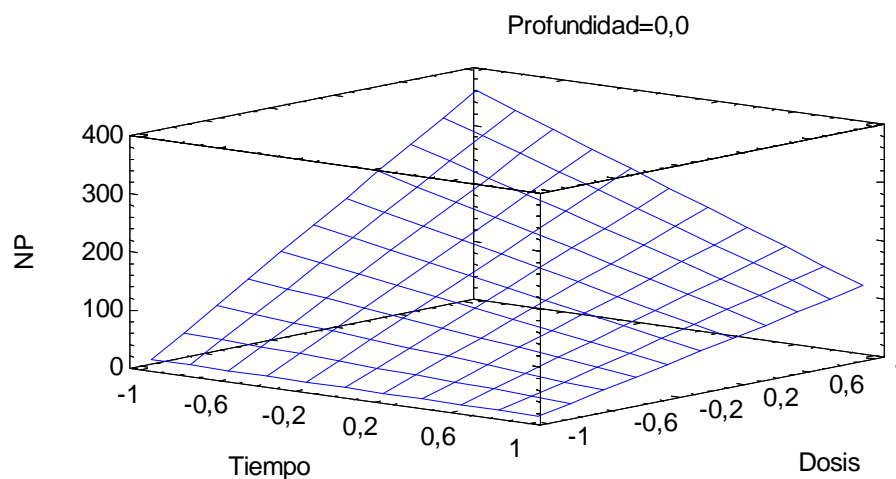


Figura 25 – Superficie de respuesta estimada para 4-NP

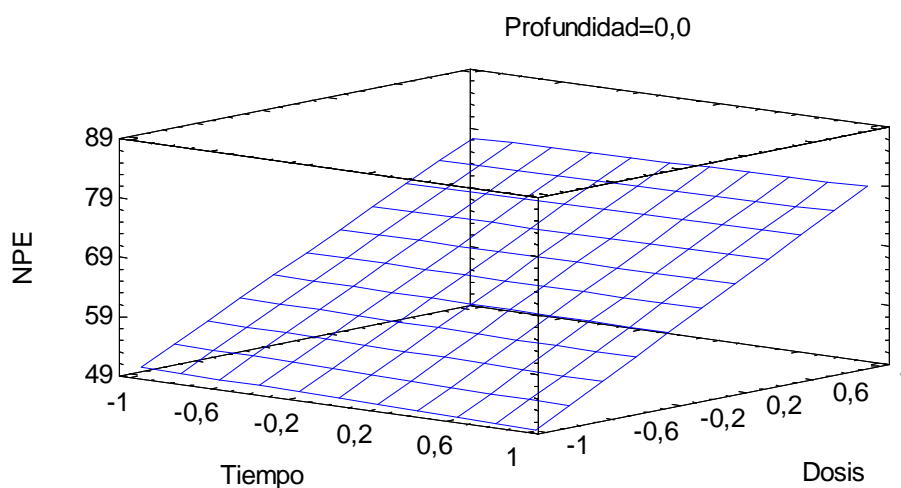


Figura 26 – Superficie de respuesta estimada para 4-NPE

Queda demostrado que estos compuestos presentan cierto grado de movilidad en el suelo, en especial en el caso de 4-NP, siendo la dosis de enmienda la variable que ejerce una mayor influencia sobre su movilidad. De esta forma, 4-NP y 4-NPE podrían movilizarse hasta cursos de aguas subterráneas, si es que la dosis de enmienda, o la concentración de estos compuestos en el biosólido, fuera muy elevada. Por otra parte, estos compuestos podrían encontrarse potencialmente biodisponibles, para ser absorbidos por plantas sembradas en suelos enmendados con biosólidos que los contengan, e ingresar de esta forma a la cadena trófica. En virtud de estas observaciones, se procedió a evaluar la biodisponibilidad de estos compuestos en el ensayo precedente.

V.7.2. Ensayo de biodisponibilidad de alquilfenoles y de etoxilatos de alquilfenol, utilizando como indicador plantas de trigo

En primera instancia, se validó el método de limpieza de extractos vegetales. Para esto, se aplicó la técnica de limpieza de extractos a soluciones multiestándar de la misma forma que se hizo con las muestras reales de plantas. Las determinaciones se realizaron en duplicado. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos analitos se muestran en la Tabla 44:

Tabla 44 – Validación del método de limpieza extractos de plantas (n=2)

Analito	Concentración Estándar [mg·L⁻¹]	Concentración recuperada promedio [mg·L⁻¹]	DE [mg·L⁻¹]	Recuperación [%]	DER [%]
4-NP	5,27	7,2	0,2	136	5
4-NPE	5,91	6,13	0,01	110,0	0,1

Una vez validada la metodología de limpieza de extractos de plantas, se procedió a determinar el contenido final de 4-NP y 4-NPE de las mezclas suelo-biosólido en las dosis de 100 Mg·ha⁻¹ (B100) y 200 Mg·ha⁻¹ (B200) (Tabla 45), y de 4-NP en las mezclas suelo-biosólido enriquecido (Tabla 46):

Tabla 45 – Concentración total de 4-NP y 4-NPE en mezclas suelo-biosólido (n=2)

Muestra	4-NP		4-NPE	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
B100	16,9	0,6	18,5	0,4
B200	28,2	0,7	28,9	0,7

Tabla 46 – Concentración total de 4-NP en mezclas suelo-biosólido enriquecido (n=2)

Muestra	4-NP	
	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
BE100	74	1
BE200	167	1

Una vez concluidas estas determinaciones, se procedió a realizar un primer ensayo, donde se hizo germinar semillas en suelo enmendado con biosólido sin enriquecer, en dosis de 100 Mg·ha⁻¹ (B100) y 200 Mg·ha⁻¹ (B200).

En la Tabla 47 se muestran las concentraciones encontradas para cada analito en plantas de trigo, tanto en raíz como en parte aérea. En esta tabla, la *masa de analitos biodisponible* corresponde a la cantidad total de cada analito (masa) extraída en cada fracción de la planta (raíz o parte aérea). Esta se obtiene directamente de la multiplicación de la concentración de analito encontrada por la masa de la fracción vegetal (no informada), y entrega información sobre la masa de analito que acumula la planta durante el periodo de cultivo.

Tabla 47 – Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido (B) en dosis de 100 y 200 Mg·ha⁻¹

Analito	Dosis [Mg·ha ⁻¹]	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Masa de analitos biodisponible [µg]	DE [µg]
4-NP	100	Aérea	3,00	0,07	3,51	0,08
		Raíz	3,8	0,1	2,7	0,1
	200	Aérea	4,5	0,1	6,1	0,1
		Raíz	5,7	0,2	3,2	0,1
4-NPE	100	Aérea	1,60	0,06	1,87	0,07
		Raíz	3,45	0,08	2,45	0,05
	200	Aérea	1,77	0,05	2,38	0,07
		raíz	6,0	0,3	3,3	0,1

En la Figura 27, se puede observar la influencia de la dosis de biosólido aplicada en cada tratamiento en la concentración de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en el trigo después de 35 días de cultivo. En primer lugar se puede observar que ambos analitos muestran un aumento importante de concentración en el trigo o biodisponibilidad al aumentar la dosis de biosólido de 100 Mg·ha⁻¹ (B100) a 200 Mg·ha⁻¹ (B200), excepto con 4-NPE en la parte aérea, en que no se observa alguna diferencia considerable.

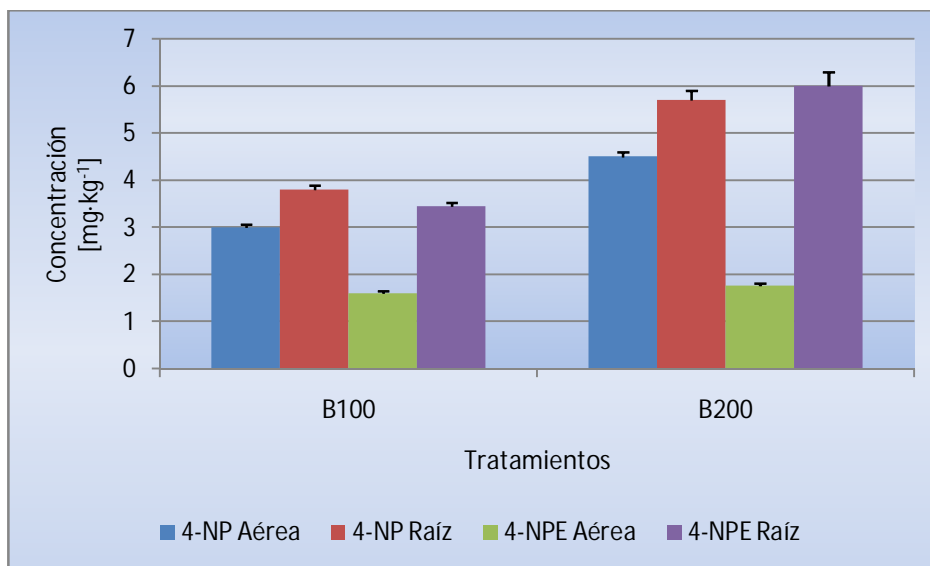


Figura 27 – Contenido de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en trigo tratado con B100 (suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg·ha⁻¹) y B200 (suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg·ha⁻¹)

Por otra parte el cambio más notable se produce en la raíz con el tratamiento B200, con el cual la concentración de 4-NPE aumenta superando incluso la concentración de 4-NP.

Se observaron siempre concentraciones mayores en la raíz que en la parte aérea, tanto en el tratamiento B100 como en B200, llegando a concentraciones de 4-NPE y 4-NP de hasta unos 6 mg·kg⁻¹ en la raíz de trigo, lo cual indicaría una mayor retención de los analitos en la raíz que en la parte aérea.

En términos generales podemos observar que efectivamente los analitos son absorbidos por el trigo en un rango de concentración de 1,6 a 6 mg·kg⁻¹ al utilizar dosis de biosólido (B) de hasta 200 Mg·ha⁻¹. La concentración en la planta está directamente relacionada con la concentración que éstos tienen en el suelo según las distintas dosis de biosólido aplicadas.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo con trigo de similares características al primero, utilizando el mismo tipo de semillas, pero usando el biosólido enriquecido con NP (BE). Se aplicaron los mismos tratamientos que en el primer cultivo: dos dosis distintas de biosólido enriquecido equivalentes a 100 Mg·ha⁻¹ (BE100) y 200 Mg·ha⁻¹ (BE200).

En la Tabla 48 se muestra la concentración de 4-NP y 4-NPE que fue encontrada en el trigo cultivado en suelo con biosólido enriquecido con 4-NP. La parte aérea y raíz se muestran por separado.

Tabla 48 – Biodisponibilidad de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en trigo cultivado con biosólido enriquecido con 4-NP (BE) en dosis de 100 Mg·ha⁻¹ y 200 Mg·ha⁻¹

Analito	Dosis [Mg·ha ⁻¹]	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Masa de analitos biodisponible [µg]	DE [µg]
4-NP	100	Aérea	7	1	12	2
		Raíz	14	4	13	4
	200	Aérea	9	4	16	7
		Raíz	33	5	25	3
4-NPE	100	Aérea	2,6	0,3	4,2	0,5
		Raíz	3,2	0,8	3,1	0,8
	200	Aérea	9	1	16	2
		Raíz	9,5	0,7	7,1	0,5

La información contenida en la Tabla 48 se presenta gráficamente a continuación (Figura 28). En esta figura se compara el efecto de la dosis de biosólido en el contenido de cada analito en el trigo cultivado:

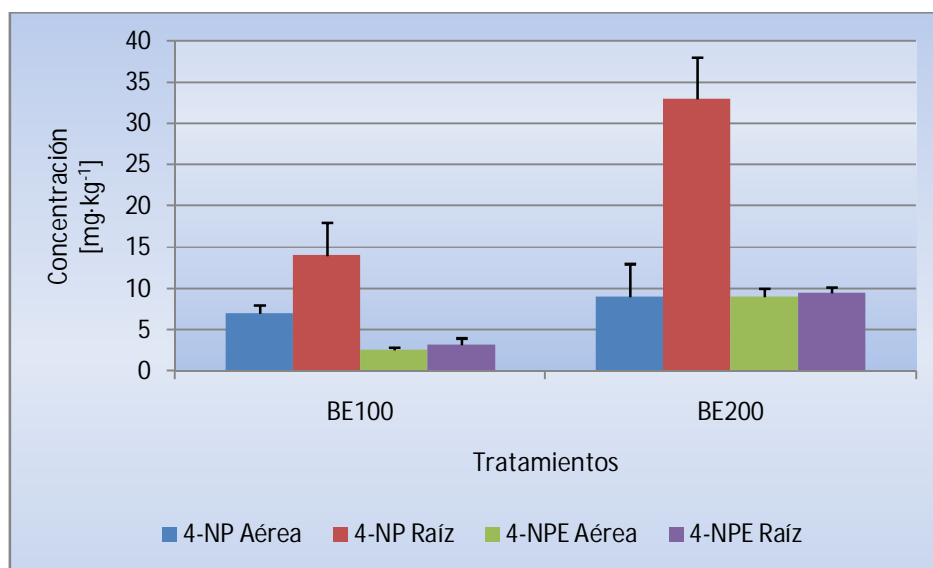


Figura 28 – Contenido de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en trigo tratado con BE100 (suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NP, en dosis de 100 Mg·ha⁻¹) y BE200 (suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NP, en dosis de 200 Mg·ha⁻¹)

Se puede observar la influencia de la dosis de biosólido enriquecido (BE) aplicada en cada tratamiento, en la concentración de nonilfenol y etoxilato de nonilfenol en el trigo: las concentraciones de los analitos aumentan junto con la dosis de biosólido aplicada en cada tratamiento.

El 4-NP muestra un aumento importante de concentración en el trigo o biodisponibilidad al utilizar el biosólido enriquecido (BE) en los tratamientos con respecto a los tratamientos con biosólido (B). Este aumento se observa también entre los dos tratamientos con biosólido enriquecido B100 y B200. La diferencia es mucho más notable en las concentraciones encontradas en la raíz, prácticamente duplicándose. En la parte aérea, 4-NP muestra un aumento pequeño en comparación con la raíz. Esto muestra como 4-NP se concentra preferentemente en la raíz.

mientras que la parte aérea prácticamente no muestra aumento entre BE100 y BE200.

Se observa una concentración mayor en la raíz que en la parte aérea, en el caso de 4-NP y 4-NPE. Para 4-NP, en el tratamiento con biosólido enriquecido (BE) en dosis de 200 Mg·ha⁻¹ se observa que la mayor concentración de alquilfenol encontrada en trigo que corresponde a 33 mg·kg⁻¹, mientras que en el tratamiento con BE, en la dosis de 100 Mg·ha⁻¹, solo se encontraron 14 mg·kg⁻¹, lo que consecuentemente con la dosis aplicada corresponde aproximadamente a la mitad, como se observa en la Tabla 42.

Se ha encontrado que 4-NP en la superficie del suelo puede ser fotodegradado más rápidamente que aquel que se encuentra fuera del alcance de la luz (Xia y col., 2004) como por ejemplo el que está en contacto con las raíces o absorbido por ellas, así el 4-NP encontrado en la parte aérea de trigo está expuesto a la luz, a diferencia de aquel localizado en la raíz. En estas condiciones la fotodegradación podría explicar la menor concentración de este analito en la parte aérea de trigo.

En términos generales podemos observar que en el suelo con biosólido enriquecido (BE), tanto 4-NP como 4-NPE, son absorbidos por el trigo en un rango de concentración de 2,6 a 33 mg·kg⁻¹ y que estas son mayores que las observadas en el trigo cultivado con biosólido sin enriquecer (B).

En el caso de 4-NP se encontró, tanto en el biosólido enriquecido (BE) como en el biosólido sin enriquecer (B) que su concentración en la planta está directamente relacionada con la concentración del alquilfenol, en el suelo según las dosis de biosólido aplicadas.

La concentración de 4-NP en trigo, tanto en raíz como en parte aérea, en los cuatro tratamientos aplicados (B100, B200, BE100 y BE200) se muestran juntos a continuación en la Tabla 49 y en la Figura 29.

Tabla 49 – Biodisponibilidad de 4-NP en trigo, para distintas dosis de biosólido y biosólido enriquecido con 4-NP

Tratamiento	Concentración de 4-NP		Concentración de 4-NP	
	Parte aérea de trigo [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Raíz de trigo [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
B100	3,00	0,07	3,8	0,1
B200	4,5	0,1	5,7	0,2
BE100	7	1	14	4
BE200	9	4	33	5

En la Figura 29, es posible apreciar la tendencia de aumento de biodisponibilidad de 4-NP en trigo con respecto al aumento de la dosis de biosólido aplicada y al aumento de analito en el suelo con distintas dosis de biosólido y biosólido enriquecido.

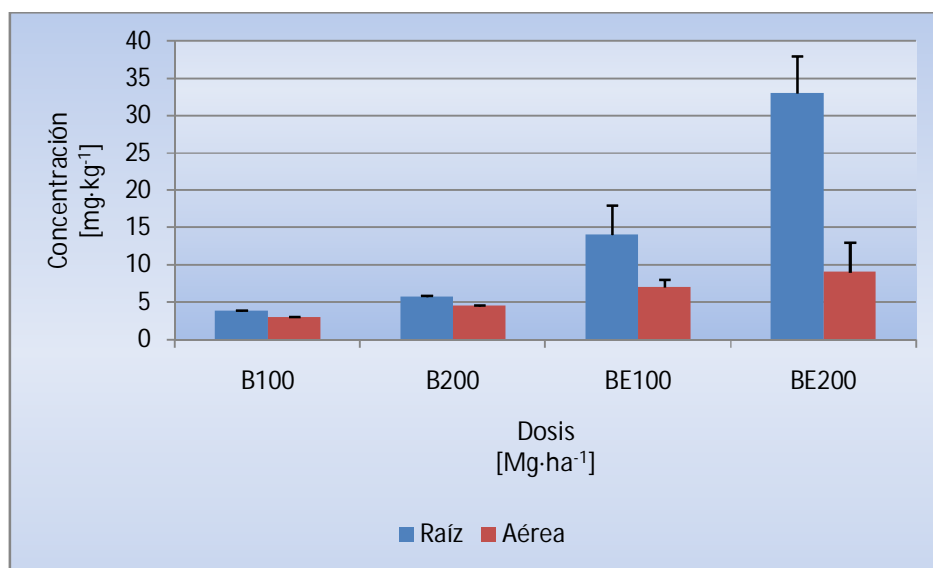


Figura 29 – Fracción biodisponible de 4-NP en la parte aérea y raíz de plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólidos natural (B100 y B200) y enriquecido con NP (BE100 y BE200)

Si consideramos que estos compuestos no presentan una gran movilidad a través del suelo, se esperaría que estuvieran más disponibles para las plantas, por lo que su presencia en grandes concentraciones en el biosólido utilizado como enmienda, permitiría su ingreso a la cadena trófica.

V.7.3. Estudio de correlación entre absorción por plantas y movilidad de 4-NP

Considerando la información obtenida a través de las columnas de lixiviación y de los ensayos con plantas de trigo, fue posible determinar la relación entre la fracción móvil de 4-NP, y el contenido del compuesto en las plantas.

Si bien la movilidad de un compuesto depende del $\text{Log } K_{oc}$, en el caso de 4-NP se determinó en la primera fracción de la columna, considerando la diferencia entre las

concentraciones del compuesto encontradas a los 15 días y a los 60 días de ensayo, para cada uno de los tratamientos con distintas dosis de biosólido.

En la Tabla 50, se muestran los resultados de la determinación de la movilidad de 4-NP observada en las columnas de lixiviación y del contenido de éste en las plantas de trigo.

La Figura 30, muestra la correlación entre el contenido de 4-NP encontrado tanto en la parte aérea como en la radicular de las plantas, se obtiene el siguiente gráfico (Figura 30):

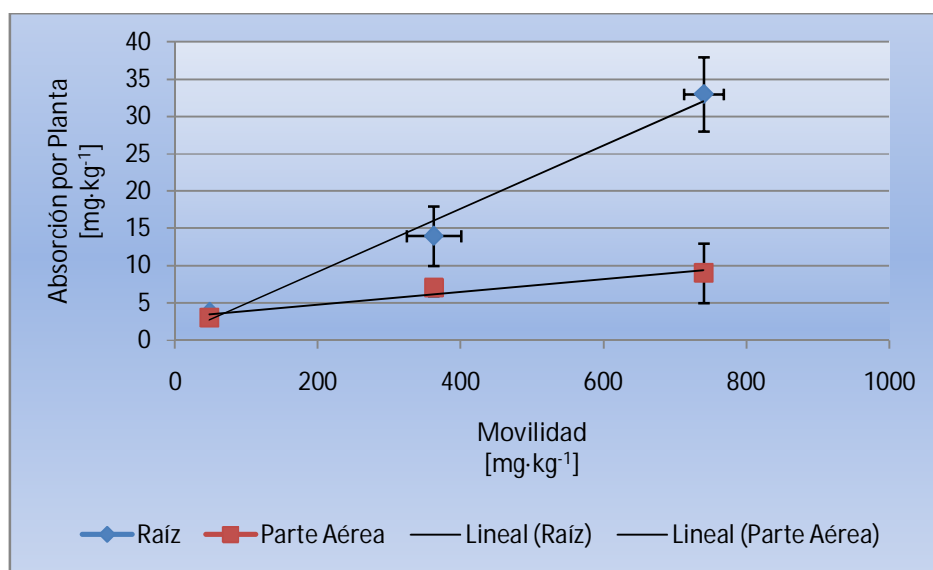


Figura 30 – Correlación entre la fracción móvil de 4-NP y el contenido de 4-NP en plantas de trigo

Las ecuaciones de regresión son las siguientes:

Parte radicular: $Concentración\ en\ Planta = 0,042 \cdot Fracción\ Móvil + 0,668$

Tabla 50 – Fracción móvil y concentración de 4-NP en planta

Sistema	Fracción móvil de 4-NP					Concentración de 4-NP en Planta			
	15 días [mg·kg ⁻¹]	60 días [mg·kg ⁻¹]	Movilidad [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Raíz		Parte Aérea	
						Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]	Promedio [mg·kg ⁻¹]	DE [mg·kg ⁻¹]
B100	67,5	16,7	50,8	47,7	4,5	3,8	0,1	3	0,07
	65,2	20,7	44,5						
BE100	523,2	134,6	388,5	362	38	14	4	7	1
	508,5	173,8	334,6						
BE200	997,1	237,5	759,6	740	28	33	5	9	4
	969,2	249,3	719,9						

Parte aérea: *Concentración en Planta* = 0,008 · *Fracción Móvil* + 3,056

Presentando coeficientes de determinación (R^2) de 0,986 y 0,941, respectivamente.

De esta forma, se demuestra que en la medida que aumenta la movilidad del 4-NP a través del suelo, su biodisponibilidad se ve favorecida, por lo que la absorción de este compuesto por la planta, también aumenta.

V.7.4. Efecto de la aplicación de biosólido en el crecimiento del trigo

En la Figura 31, se observa el efecto que tiene la aplicación de biosólido en el crecimiento de trigo y en definitiva la incorporación de materia orgánica, micro y macro nutrientes, en el crecimiento de las diferentes partes de la planta, específicamente en el caso del trigo, y probablemente extrapolable otras especies.

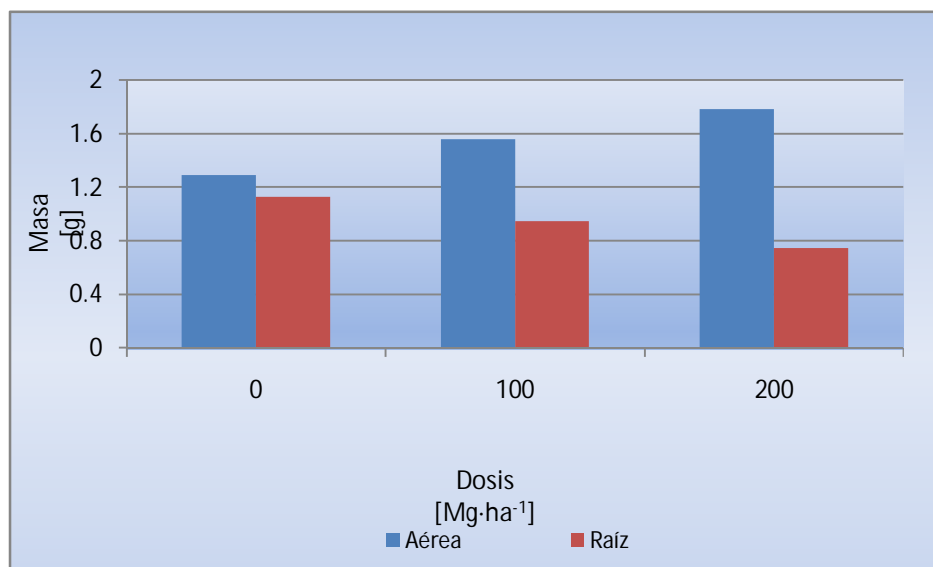


Figura 31 – Efecto de dosis de biosólido sobre la biomasa de las plantas de trigo

Claramente se observa una tendencia decreciente en el tamaño o cantidad de raíces a medida que la disponibilidad de materia orgánica en el sustrato aumenta, paralelamente con la dosis de biosólido aplicado. Por el contrario, se observa un mayor desarrollo de la parte aérea, obteniéndose un mayor rendimiento, en la medida que la dosis de biosólido aplicado aumenta, lo que concuerda con estudios realizados en plantas de arroz (*Oryza sativa*) (Singh y Agrawal, 2010a) y en frijol verde (*Vigna radiata*) (Singh y Agrawal, 2010b).

Si bien la utilización de biosólidos como enmienda en diferentes dosis, e incluso su aplicación sostenida en los años, no ha demostrado ser perjudicial para las plantas (Sukkariyah et al., 2005), se debe considerar que los biosólidos constituyen una matriz compleja que incluye numerosos contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, que podrían ser incorporados por las plantas, e

introducidos a la cadena trófica, de no limitar la dosis de enmienda adecuadamente (Singh y Agrawal, 2010b).

VI. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y a los objetivos propuestos se puede concluir lo siguiente:

Se optimizó la separación y determinación de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol (4-t-OP, 4-NP, 4-n-OP, 4-OPE y 4-NPE) por cromatografía gaseosa con detector de masas, alcanzándose respuestas con un alto grado de linealidad y bajos límites de detección y cuantificación en todos los compuestos estudiados

Se optimizaron tres metodologías de extracción de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol desde biosólidos, utilizando un biosólido que contenía nativamente a estos compuestos, con una alta concentración de 4-NP y 4-NPE. Las metodologías se basaron en la extracción con disolventes presurizados: en batch, y en modo híbrido, utilizando como fuente de energía, un horno, y ultrasonido. Debido a que la extracción de estos compuestos desde la matriz elegida depende de varios factores, la optimización se realizó a través de un diseño experimental de análisis multivariado, con un diseño central de compuesto circunscrito (CCD), que entregó valores óptimos para cada metodología.

La metodología de extracción con solventes presurizados en batch fue la mejor, ya que presentó una mayor recuperación de los analitos. Las condiciones óptimas para esta metodología fueron: 129 °C, 34 minutos por ciclo, en dos ciclos, y solvente de extracción, acetona. En estas condiciones, la acetona

disminuye su permitividad relativa, llegando a un valor ($\epsilon_r=10,68$) intermedio entre su permitividad relativa y la permitividad relativa del hexano, en condiciones normales de temperatura y presión, por lo tanto su polaridad se ve disminuida.

Comparativamente con la extracción Soxhlet, esta metodología optimizada resultó ser más eficiente, en cuanto al tiempo de extracción y cantidad de disolvente, siendo comparables en cuanto a la extracción de los analitos en estudio.

Con respecto a la aplicación medioambiental de esta metodología de extracción optimizada, fue utilizada en ensayos de movilidad y biodisponibilidad en plantas de trigo.

La movilidad de 4-NP y 4-NPE mostró ser relativamente moderada. De esta forma, tanto 4-NP, como 4-NPE, presentes en el biosólido, estarían disponibles para ser absorbidos por las plantas.

La biodisponibilidad de los analitos seleccionados fue determinada mediante la extracción exhaustiva en muestras de trigo cultivado en suelo, con diferentes dosis de biosólido (B) y biosólido enriquecido (BE) con 4-NP. 4-NP y 4-NPE son los analitos encontrados en mayor concentración en el trigo. En particular la concentración de 4-NP en trigo varía entre $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $33 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, y la de 4-NPE entre $1,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $9,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Es posible afirmar que estos analitos estarían significativamente biodisponibles para el trigo, cultivado en suelo tratado con biosólido.

La correlación entre el contenido de 4-NP en las plantas y fracción móvil determinada a través de columnas de lixiviación, correlacionó

satisfactoriamente, tanto para la parte radicular, como para la parte aérea de la planta.

VII. REFERENCIAS

- Aguilera S., S.M., Borie B., G., Peirano V., P., Galindo G., G. 1997. Organic matter in Volcanic Soils in Chile: Chemical and Biochemical Characterization. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 28, 899 – 912.
- Aguilera, S.M., Rodríguez, M. 2005. Desarrollo de prácticas sustentables de reciclaje de biosólidos en plantaciones forestales. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Forestales.
- Aguilera, S.M., Borie, G., Peirano, P., Rodríguez, M., Grez, I., and Zunino, H. 2007. Chemical Characterization of Sewage Sludges in Chile and their potential utilization as Amendment to Reclame Soils for Forestation Purpose. *J. Plant Nut.*, Accepted Manuscript
- Ahumada, I., Escudero, P., Carrasco, M.A., Castillo, G., Ascar, L., Fuentes, E. 2004. Use of sequential extraction to assess the influence of sewage sludge amendment on metal mobility in Chilean soils. *J. Environ. Monit.* 6, 327 – 334.
- Anderson, G.S., Miller, R.C., Goodwin, A.R.H. 2000. *J. Chem. Eng. Data* 45(4), 549 – 554
- Ascar, L., Ahumada, I., Richter, P. 2007. Effect of biosolid incorporation on arsenic distribution in Mollisol soils in central Chile. *Chemosphere*, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.012
- Babak S.F., Udovenko V.V. 1950.

Zh.Obshch.Khim., 20(12), 2124-2126

- Baez, M.E, Zincker, J. 1999. Parámetros de calidad analítica de un método de determinación multiresiduos de plaguicidas por HPLC-DAD.

Bol. Soc. Chil. Quím. v.44 n.3.

- Brown, S., Devin-Clarke, D., Doubrava, M., O'Connor, G. 2009. Fate of 4-nonylphenol in a biosolids amended soil.

Chemosphere 75, 549–554

- Camel, Valérie. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices – supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls.

Analyst 126, 1182 – 1193.

- Darwish, O. H., Persaud, N., Martens, D. C., 1995. Effect of long-term application of animal manure on physical properties of three soils.

Plant Soil 176, 289–295.

- Dean, J.A. 1999. Lange's Handbook of Chemistry. Fifteenth Edition. McGraw-Hill.

- Dec, J., Bollag, J. 1997. Determination of covalent and non-covalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil.

Soil Sci 162, 858 – 874.

- DIONEX. 2004. Extraction of PAHs from Environmental Samples by Accelerated Solvent Extraction (ASE®). Application Note 313.

- During, R.-A., Krahe, S., Gath, S., 2002. Sorption behavior of nonylphenol in terrestrial soils.

Environ. Sci. Technol. 36, 4052–4057.

- Ehlers, G.A.C., loibner, A.P. 2006. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction. 2006. Environ. Pollut. 141, 494 – 512.
- Epstein E. 2003. Land Application of Sewage Sludge and Biosolids. Lewis Publishers. CRC Press. Boca Raton, USA.
- FAO. 2000. Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas. Evaluación de la contaminación del suelo. Manual de referencia.
- Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Buszewski, B. 2007. Isolation, purification and determination of 4-n-Nonylphenol and 4-tert-Octylphenol in aqueous and biological samples. Talanta, doi:10.1016/j.talanta.2007.06.028
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C.. Bound pesticide residues in soils: a review. 2000. Environ. Pollut. 108, 3 – 14.
- Gibson, R.W., Wang, M.J., Padgett, E., Lopez-Real, J.M., Beck, A.J. 2007. Impacto of drying and composting procedures on the concentrations of 4-nonylphenols, di-(2-ethylhexyl)phthalate and polychlorinated biphenyls in anaerobically digested sewage sludge. Chemosphere 68, 1352 – 1358.
- Goss F.R. 1940. J.Chem.Soc.London, 888 – 894.
- Guerra, P., Ahumada, I., Carrasco, A. 2007. Effect of biosolid incorporation to mollisol soils on Cr, Cu, Ni, Pb and Zn fractionation, and relationship with their bioavailability.

Chemosphere 68, 2021 – 2027.

- Höllrigl-Rosta, A., Vinken, R., Lenz, M., Schäffer, A., 2003. Sorption and dialysis experiments to assess the binding of phenolic xenobiotics to dissolved organic matter in soil.

Environ. Toxicol. Chem. 22, 746–752.

- Huang, W., Schlautman, M.A., Weber Jr., W.J., 1996. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments 5: The influence of near-surface characteristics in mineral domains.

Environ. Sci. Technol. 30, 2993 – 3000.

- Instituto Nacional de Normalización, INN. 2004a. Norma Chilena NCh 2880 Of2004. Compost – Clasificación y requisitos. Santiago, Chile.

- Instituto Nacional de Normalización, INN. 2004b. Norma Chilena NCh 2952.c2004. Lodos – Requisitos y condiciones para un plan de aplicación en suelos. Santiago, Chile.

- IUPAC. Müller, S. and C. Schlatter. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Oestrogenic potency of nonylphenol in vivo – a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure.

Pure & Appl. Chem. 70, 1847 – 1853.

- Jacobsen, A. M., Mortensen, G.K., and Bruun Hansen, H.C. 2004. Organic Compound in the Environment. Degradation and mobility of Linear Alkylbenzene Sulfonate and Nonylphenol in Sludge-Amended Soil.

J. Environ. Qual. 33, 232 – 240.

- Joerges M., Nikuradse A. 1950. Z.Naturforsch.A, 5, 259 – 269.

- Jouyban, A., Soltanpour, S., Chan, H.K. 2004. A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature. *Int. J. Pharm.* 269, 353 – 360.
- Khimenko M.T., Aleksandrov V.V., Gritsenko N.N. 1973. *Zh.Fiz.Khim.*, 47(11), 2914 – 2915.
- Khimenko M.T., Litinskaya V.V., Tkachenko E.P. 1982. *Oniitekhim*, Code 724 KHP-D82, 1 – 15.
- King, L. D., Rudgers, L. A., and Webber, L. R. 1974. Application of Municipal Refuse and Liquid Sewage Sludge to Agricultural Land: I. Field Study. *J. Environ. Qual.* 3, 361 – 366.
- Kojima, M., Tsunoi, S., Tanaka, M. 2003. Determination of 4-alkylphenols by novel derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 984, 237 – 243.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., and Mainor, T.M. 2001. Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environ. Sci. Technol.* 35(4): 4798 – 4804.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W., Lester, J.N. 2005. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* 61, 1221 – 1230.
- Levichev S.A. 1964. *Fiziko-chimiceskie Svoystva Rastvorov (J.80)*, Leningrad, 219-226.

- Li, B. Y., Zhou, D. M., Cang, L., Zhang, H. L., Fan, X. H. and Qin, S. W., 2007. Soil micronutrient availability to crops as affected by long-term inorganic and organic fertilizer applications. *Soil Till. Res.* 96, 166-173.
- Lide, David R. 2004. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 84th edition 2003 – 2004. CRC Press.
- Lopez de Alda, M.J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D. 2003. Liquid chromatography - (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* 1000, 503 – 526.
- Loyo-Rosales, J.E., Schmitz-Afonso, I., Rice, C.P., Torrents, A. 2003. Analysis of Octyl- and Nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by Liquid Chromatography/Tandem mass spectrometry. *Anal. Chem* 75, 4811 – 4817.
- Marcus, Y. 1998. *The Properties of Solvents / Yitzhak Marcus*. Wiley Series in solution chemistry: volume 4. John Wiley and Sons.
- Marshall, W.L. 2008. Dielectric Constant of Water Discovered to be Simple Function of Density over Extreme Ranges from – 35 to + 600°C and to 1200 MPa (12000 Atm.), Believed Universal. Available from Nature Precedings <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2008.2472.1>>
- Meesters, R.J.W., Schröder, H.Fr. 2002. Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge. *Anal. Chem.* 74, 3566 – 3574.

- Ministerio Secretaría General de la Presidencia, Subsecretaría General de la Presidencia. 2009. Decreto 4. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas.
- Nuñez, L., Turiel, E., Tadeo, J.L.. 2007. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxilates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 1146, 157 – 163.
- Omar, S.A., 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J. Microb. Biot.* 14, 211–218.
- Pawliszyn, J. 2003. Sample Preparation: Quo Vadis?. *Anal. Chem.* 75, 2543 – 2558
- Peng, X., Wang, Z., Mai, B., Chen, F., Chen, S., Tan, J., Yu, Y., Tang, C., Li, K., Zhang, G., Yang, C. 2007. Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Peral River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary. *Sci.Total Environ.*, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.05.043.
- Petrovic, M., Lacorte, S., Viana,P., Barceló, D. 2002. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediments. *J. Chromatogr. A.* 959, 15 – 23.
- Pignatello, J.J., Xing, B.. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemical to natural particles.

Environ. Sci. Technol. 30, 1 – 11.

- Pimenova N.I., Afanas'Ev V.N., Davydova O.I., Krestov G.A. 1984. Izv.Vyssh.Uchebn.Zaved.Khim.Khim.Tekhnol., 27(9), 1043 – 1045.
- Pitzer, K.S. 1955. J. Am. Chem. Soc. 77, 3427.
- Reichardt, Christian. 2003. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. Third Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Reid, R.C. 1977. The properties of gases and liquids, their estimation and correlation. Third Edition. McGraw-Hill Book Company.
- Richardson, S.D., and Ternes, T.A.. 2005. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. Anal. Chem. Acta 77: 3807 – 3838.
- Richter, P., Jiménez, M., Salazar, R., Maricán, A. 2006. Ultrasound-assisted pressurized solvent extraction for aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. J. Chromatogr. A. 1132:15 – 20.
- Rusanov A.I., Levichev S.A., Tyushin V.Ya. 1966. Vestn.Leningr.Univ., 121-127
- Sabik, H., Gagné, F., Blaise, C., Marcogliese, D.J., Jeannot, R. 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). Chemosphere 51: 349 – 356.
- Sadzawka, A., Carrasco, M.A., Grez, R., Mora, M.D.L.L., Flores, H., Neaman, A. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revisión

2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas INIA N°34, Santiago, Chile, 164p.

- Schadow E., Steiner R. 1969. Z.Phys.Chem.(München) , 66, 105 – 117.
- Singh, R.P., Agrawal, M. 2010a. Variations in heavy metal accumulation, growth, and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates.
Ecotox. Environ. Safe. 73, 632–641.
- Singh, R.P., Agrawal, M. 2010b. Effect of different sewage sludge applications on growth and yield of *Vigna radiata* L. field crop: Metal uptake by plant.
Ecol. Eng. 36, 969–972.
- Sukkariyah, B.F, Evanylo, G., Zelasny, L., Chaney, R.L. 2005. Cadmium, Copper, Nickel, and Zinc Availability in a Biosolids-Amended Piedmont Soil Years after Application.
J. Environ. Qual. 34, 2255–2262.
- Superintendencia de Servicios Sanitarios. 2006. Informe de Gestión del Sector Sanitario.
- Thirukkumaran, C. M. and Parkinson, D. 2000. Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended with nitrogen and phosphorus fertilizer.
Soil Biol. Biochem. 32, 59–66.
- Tugarev I.A., Avdus Z.I., Nozdrev V.F. 1975.
Zh.Fiz.Khim., 49(5), 1256-1258

- U.S. Environmental Protection Agency. 1982. Sludge and the Land: The Role of Soil and Water Conservation Districts in Land Application of Sewage Sludge. Final Report. Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1996. SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Method 3540C: Soxhlet Extraction. Revision 3. 3000 Series Methods.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Office of Solid Waste. EPA530-R-99-009.
- U.S. Environmental Protection Agency. Office of Water 430AT. 2005. Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria – Nonylphenol Final.
- Water Environment Association of Ontario (WEAO), 2001, Fate and Significance of Selected Contaminants in Sewage Biosolids Applied to Agricultural Land through Literature Review and Consultation with Stakeholder Groups, Aurora, Ontario.
- Xia, K., and Yoon Jeoung, C. 2004. Photodegradation of the Endocrine-Disrupting Chemical 4-Nonylphenol in Biosolids Applied Soil. *J. Environ. Qual.* 33:1568 – 1574
- Xiang, H.W. 2005. The Corresponding-States Principle and its Practice: Thermodynamic, Transport and Surface Properties of Fluids. Elsevier B.V.
- Yaws, C.L. 2001. Matheson Gas Data Book. Seventh Edition. McGraw-Hill.
- Yu Y., Xu J., Sun H., Dai S. 2008. Sediment–porewater partition of nonylphenol polyethoxylates: field measurements from Lanzhou Reach of Yellow River, China.

Arch. Environ. Contam. Toxicol. 55, 173 – 9