



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

**« DETERMINACIÓN DE SULFONATOS DE
ALQUILBENCENO LINEALES (LAS) EN
BIOSÓLIDOS Y SUELOS TRATADOS CON
BIOSÓLIDOS »**

Tesis para optar a título de Químico

Mauricio Simón del Valle Esparza

Directores de Tesis: Prof. Dr. Pablo Richter T., Prof. Asoc. Inés Ahumada

Santiago, Chile, 2006

A la memoria de mi madre

AGRADECIMIENTOS

A mi querida familia, mi padre, mis hermanos, cuñados y sobrinos los cuales han sido la base espiritual y valorica en todos mis logros y son todo para mi.

En especial a la persona que me dio la vida, mi madre, que estuvo y estará siempre conmigo.

A mis tíos y primos que de una u otra manera también me han apoyado.

A mis directores de tesis que confiaron en mí, y que entregaron todos sus conocimientos y experiencias en el desarrollo de este trabajo. En forma muy especial a la profesora Inés Ahumada, que me entrego cariño, amistad y comprensión, la cual siempre estará presente en mi nueva vida, que hoy comienza.

A mis amigos de infancia con los cuales crecimos juntos pasando por momentos difíciles y momentos de alegría, siendo un pilar fundamental en mi vida.

A mis compañeros de carrera, con los que recorrí este camino de enseñanza y formación profesional, gracias por su amistad y cariño recibido.

A todos los profesores y docentes que compartieron conmigo a lo largo de esta carrera, entregando todo su conocimiento y apoyo.

A mis compañeros y personal del laboratorio de química ambiental, gracias por recibirme de esa manera tan acogedora, y darme la posibilidad de conocerlos.

Al SEREMI de salud de la Región Metropolitana especialmente al laboratorio de salud ambiental, donde se realizo parte de esta memoria, gracias por el apoyo técnico, calidad profesional y humana de sus integrantes.

A los proyectos que financiaron esta investigación FONDECYT 1030005 y 1050288.

RESUMEN

En la actualidad los biosólidos generados en las plantas de tratamientos de aguas servidas de la Región Metropolitana, son acumulados en monorrellenos considerados seguros, mientras se estudian alternativas para su reutilización. Una de éstas podría ser, su utilización en agricultura, aprovechando su poder fertilizante y de mejorador de suelos. La aplicación de biosólidos a suelos, podría incorporar una serie de contaminantes orgánicos, incluyendo algunos tipos de surfactantes aniónicos, entre éstos, los sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS), presentes en la mayoría de los agentes de limpieza, detergentes comerciales y por consiguiente en las aguas residuales de uso doméstico.

Se estima que el contenido de LAS presente en estos biosólidos, puede encontrarse en el orden de g kg^{-1} , debido a que no son degradados por el proceso biológico anaeróbico, usualmente utilizado en la estabilización de los lodos. Debido a las características estructurales de estos surfactantes y a su degradabilidad en condiciones aeróbicas, podrían incorporar contaminantes orgánicos e inorgánicos a los suelos, al ser utilizados los biosólidos con fines agrícolas.

El objetivo del presente estudio fue optimizar un método de extracción de LAS en muestras de biosólido, para ser aplicado a suelos y a mezclas suelo-biosólido.

Para determinar el contenido de LAS en los distintos sustratos, hubo que realizar un proceso de derivatización a través de la formación de pares iónicos, con bisulfato de tetrabutilamonio (TBA-H), el que fue extraído con CHCl_3 ayudado por un sistema de ultrasonido y posterior alquilación en el inyector (“inyector-port”) del cromatógrafo. Los compuestos de LAS en las distintas muestras fueron identificados y confirmados por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), utilizando como estándar interno la sal sódica del ácido 4-octilbencenosulfónico (C_8 -LAS). Se consideró la sumatoria total de las áreas de las distintas familias encontradas, las que fueron normalizadas a través de la razón de áreas con el estándar interno. Para su cuantificación, se utilizó una curva de calibración del estándar de la mezcla de LAS, en un rango de concentración de 250 a 4000 mg L^{-1} .

Para determinar las condiciones óptimas de extracción de LAS desde los biosólidos, se realizó un diseño factorial (3^2), obteniéndose una superficie de respuesta, tomando en cuenta dos factores significativos a tres niveles, tres centros y una respuesta. Por tanto, según los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de extracción fueron: concentración de TBA-H 0,30 M y 23 minutos de ultrasonido. Se determinaron los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) cuyos valores fueron 51 mg kg^{-1} y 170 mg kg^{-1} respectivamente. Se encontró adecuada la metodología propuesta para la determinación de LAS en biosólidos, ya que en muestras de este sustrato enriquecidas con 3 y 7 g kg^{-1} de LAS, se obtuvo recuperaciones alrededor del 100 %, con coeficientes de variación entre 3,7 y 4,5 %. Se realizó un estudio similar en muestras de suelos enriquecidas con LAS, comprobándose que esta metodología puede ser también, aplicada a la determinación de estos compuestos en suelos.

Se encontraron valores de contenido de LAS en los dos biosólidos estudiados similares a los encontrados en biosólidos de otros países, con concentraciones de de 4,0 y $7,9 \text{ g kg}^{-1}$ respectivamente. En los cuatro suelos estudiados: EM, LP, M y CB, se encontraron similares contenidos de LAS ($0,6 \text{ g kg}^{-1}$). La incorporación del biosólido seleccionado a los suelos, aumentó significativamente la concentración de LAS y el proceso de incubación originó una disminución del contenido de LAS en todas las muestras, que puede ser atribuido a una reacción de degradación. La degradación de los compuestos de LAS de los suelos tratados con biosólidos fue similar en todas las muestras. En los suelos enriquecidos con LAS, la degradación de estos compuestos fue menor en el suelo de tipo arenoso y con menor contenido de materia orgánica. En los suelos enriquecidos con LAS y tratados con biosólidos, la degradación fue mayor en los suelos con alto contenido de materia orgánica.

SUMMARY

At present, biosolids generated at wastewater treatment plants in the Metropolitan Region are gathered in supposedly secure monofills, while alternatives are studied for their reutilization. One of these might be their utilization in agriculture, in order to make use of their soil fertilizing and improving properties. Biosolid application to soils could incorporate a series of organic contaminants, including some types of anionic surfactants, among them linear alkylbenzene sulfonates (LAS), present in most cleaning agents, household detergents and thus in household wastewater.

It is estimated that the contents of LAS in these biosolids may be in the order of g kg^{-1} , as a result of their not being degraded by the anaerobic biological process usually employed in sludge stabilization. Because of the structural characteristics of these surfactants and their degradability in aerobic conditions, they could incorporate organic and inorganic contaminants to soils if biosolids were used for agricultural purposes.

The purpose of this study was to optimize a method for LAS extraction from biosolid samples with a view to its application to soils and soil-biosolid mixtures.

In order to determine LAS content in the different substrate, a derivatizing process had to be carried out through ionic pair formation, with tetrabutylammonium bisulfate (TBA-H) extracted with CHCl_3 assisted with ultrasound and further alkylation in the chromatograph injector (“injector-port”). LAS compounds from the different samples were identified and confirmed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), using the sodium salt of octylbenzene sulfonic acid (C_8 -LAS) as an internal standard. Results included the total sum of the areas of the different families found, standardized through the area-to-internal standard ratio. For their quantification, a calibration curve of LAS mixture standard in a concentration range of 250 to 4000 mg L^{-1} .

For the determination of LAS optimum extracting conditions from biosolids, a factorial design (3^2) was carried to obtain a response surface, taking into account two significant three-level factors, three centers and one response. Thus, according to the results, the optimum extracting conditions were: TBA-H concentration, 0.30 M and 23 min sonication. Detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) were determined as

51 mg kg⁻¹ and 170 mg kg⁻¹, respectively. The proposed methodology for LAS determination in biosolids was found adequate since in spiked samples with 3 and 7 g kg⁻¹ LAS, recoveries of about 100% were reached, with variation coefficients from 3,7 to 4,5 %. A similar study was done on soil samples spiked with LAS, demonstrating that the methodology may also be applied to determine these compounds in soils.

The values of LAS content in the two biosolids under study were similar to those found in other countries, with concentrations of 4,0 and 7,9 g kg⁻¹, respectively. The four soils of our study : EM, LP, M, and CB showed similar LAS content (0,6 g kg⁻¹). Incorporation of the selected biosolid to the soils caused a significant increase in LAS concentration and incubation caused a decrease in LAS contents in all of the samples. In LAS-enriched soils, degradation of these compounds was smaller in the sandy kind of soil, with less organic matter. In LAS-enriched soils treated with biosolids, degradation was higher in soils with a high content of organic matter.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	11
Extracción por ultrasonido	19
Extracción por microondas	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo General	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Reactivos	22
3.2 Materiales	23
3.3 Soluciones	23
Solución agente derivatizante bisulfato de tetrabutilamonio (TBA-H).	23
Solución de sal sódica del ácido 4-octilbencenosulfónico (C ₈ -LAS).	24
3.4 Equipo Menor	24
3.5 Equipo Mayor	25
3.6 Descripción de muestras utilizadas	25
3.6.1 Biosólidos	25
Características químicas de los biosólidos	26
3.6.2 Suelos	26
Caracterización química de los Suelos	28
3.7 Ensayos de Incubación de muestras.	29
3.7.1 Enriquecimiento de las muestras de suelo con LAS	29
3.7.2 Suelo tratado con biosólido y enriquecido con LAS	29
3.7.3 Suelo tratado con biosólido	29
3.8 MÉTODOS	30
3.8.1 Estudio de la reacción de derivatización de LAS.	30

Derivatización en matrices acuosas.	30
Condiciones cromatográficas GC-FID	31
Programa térmico	31
Derivatización de la sal sódica del ácido 4- octilbencenosulfónico (C₈-LAS).	32
3.8.2 Evaluación de parámetros en la reacción	32
3.8.3 Extracción con solvente método convencional para lodos	33
3.8.4 Extracción acuosa desde matriz sólida	33
3.8.5 Método propuesto	34
Condiciones cromatográficas GC-MS	34
3.8.6 Estudio del efecto de factores relacionados con la eficiencia de la reacción y la extracción de la muestra.	35
Optimización de la Extracción	35
3.8.7 Derivatización del estándar interno C ₈ -LAS	36
3.8.8 Metodología optimizada	37
3.8.9 Condiciones cromatográficas optimizadas GC-FID	37
3.8.10 Validación del Método Analítico	38
4. RESULTADOS Y DISCUSION	40
4.1 Derivatización - Ensayos preliminares.	40
4.2 Evaluación de la reacción de derivatización	42
4.2.1 Efecto de la Temperatura	42
4.2.2 Efecto del tiempo de agitación	42
4.2.3 Efecto de la concentración de TBA-H	43
4.2.4 Efecto de agentes extractantes	43
4.2.5 Efecto de la radiación de ultrasonido	43
4.3 Extracción convencional en muestras de biosólidos	44
4.4 Extracción acuosa en muestras de biosólido	44
4.5 Comparación de la extracción acuosa y metodología propuesta	44
4.6 Determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	45
4.6.1 Interpretación de espectros de masas	46

4.7 Optimización de variables del método de extracción de LAS a través del análisis multivariado	51
4.7.1 Efectos estimados e interacciones	52
Tabla 4.7- Rangos estudiados y respuestas máxima y combinada de las variables consideradas en el estudio de optimización.	57
4.8 Curvas de calibración	58
4.9 Validación del método	61
4.10 Determinación de LAS en muestras de biosólidos y suelos	62
4.11 Contenido de LAS en los suelos y estudio de degradación	65
4.12 Determinación de LAS en suelos enriquecidos con 0,2 y 1,0 g kg⁻¹ antes de la incubación	66
4.13 Determinación de LAS en suelos tratados con biosólido antes de la incubación	66
4.14 Determinación de LAS en muestras después del proceso de incubación	67
4.15 Contenido de LAS en los suelos Control y tratados con LAS y biosólido BET2005	68
Figura 4.21-Cromatograma del suelo, La Paloma (LP), enriquecido con 1,0 g kg ⁻¹ de LAS ;— 0 días ; — 30 días.	70
5 CONCLUSIONES	71
6 REFERENCIAS	74

1. INTRODUCCION

En la actualidad en Chile existe una gran preocupación por el tratamiento de aguas para su reutilización en riego de cultivos y también para lograr un efluente que no contamine el medioambiente. El plan de saneamiento hídrico para la cuenca de Santiago, consideró en el año 2000 la construcción de tres grandes plantas de tratamiento de aguas en la capital: La Farfana, El Trebal y Los Nogales, además de trece plantas ubicadas en zonas periféricas, que permitiría tratar antes del año 2010, el 100% de las aguas servidas tanto de origen domiciliario como industrial de la Región Metropolitana (SISS, 2000).

La Farfana es una de las cinco plantas más grandes del mundo, y trata actualmente el 50% de las aguas servidas generadas en Santiago, tratando aproximadamente un caudal de $8,8 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, esta obra es considerada como la inversión ambiental más grande realizada hasta ahora en Chile. La planta de tratamiento El Trebal opera actualmente con un caudal de $4,4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, descontaminando aproximadamente el 23% del total de aguas servidas, se calcula que en conjunto la Farfana y El Trebal tratan más del 70% de las aguas de la ciudad de Santiago (Aguas Andinas S.A, 2003).

Se estima que para principios del año 2009, el funcionamiento de la planta de tratamiento Los Nogales completaría el 100% de la descontaminación de las aguas producidas por los habitantes de la cuenca de Santiago.

El tratamiento de estas agua residuales, trae consigo un gran problema ambiental, que es la generación de grandes cantidades de volúmenes de lodos sanitarios, los cuales son dispuestos en rellenos sanitarios o en monorrellenos mientras se estudian alternativas para su reutilización. Los lodos sanitarios son sólidos, semisólidos o líquidos generados de este tratamiento, se denomina lodos estabilizados o biosólidos a aquellos lodos que han sido sometidos a procesos de estabilización biológica, física o química (INN, 2004).

El proceso de formación de lodos parte con la recolección de las aguas servidas, las cuales son clarificadas generando un lodo primario, el cual es espesado y luego transportado a una cámara de mezcla donde es recibido en conjunto con los lodos biológicos o secundarios. A la cámara de mezcla también llegan las espumas, grasas y aceites concentrados. Todo este material es homogeneizado y transferido a un digestor, generalmente anaeróbico, donde las comunidades bacterianas presentes realizan la destrucción de un gran porcentaje de la carga orgánica de estos lodos. Se produce aquí la etapa de estabilización, donde por acción de la temperatura, generalmente 35 °C y una permanencia de alrededor de 25 días, se debe producir una disminución mínima del 38 % en el contenido de sólidos volátiles. El biogas generado en este proceso de digestión es utilizado como combustible en el proceso y el excedente es combustionado en una antorcha.

Los lodos ya tratados pasan por dos procesos de deshidratación, el primero es el desaguado (deshidratación mecánica) que se produce en centrífugas donde se agrega un polielectrolito catiónico de alto peso molecular y biodegradable, que ayuda a la floculación de la materia sólida presente en los lodos. En caso de ser necesario se aplica cal a la salida de las centrífugas para evitar la emisión de olores. El segundo proceso consiste en el acopio en canchas de secado donde permanecen los lodos por más 40 días, para luego ser enviados al sitio de disposición final (Aguas Andinas S.A.,2003).

En la actualidad, en la Comunidad Económica Europea y en Estados Unidos se observan diferentes tipos de opciones de manejo para los lodos. Algunos países, utilizan estos lodos como mejoradores de suelos o como materia prima para compost, en otros, se disponen en rellenos sanitarios o se incineran en plantas de combustión, predominando los usos comerciales.

Existe preocupación a nivel internacional por el uso de estos lodos, sobre todo si se utilizan como mejoradores de suelo. Se han realizado diversos estudios y se han propuesto normas en distintas partes del mundo, para regular los niveles de los contaminantes que pueden estar presentes en esta matriz (Mortensen y col., 2001) ,principalmente por el hecho de que una parte importante de su composición correspondería a materia orgánica, que debido a su complejidad, puede actuar como concentrador de compuestos químicos peligrosos para el medio ambiente o la salud del ser humano.

Una de las soluciones para mejorar suelos de uso agrícola es la utilización de estos biosólidos aprovechando su alto contenido de materia orgánica y nutrientes que al ser incorporados al suelo favorece sus propiedades físicas, químicas y biológicas, actuando como estructurador de suelos degradados.

Los lodos contienen un menor contenido de nutrientes en comparación con los fertilizantes químicos, sin embargo, el uso reduce consecuentemente los impactos producidos en el ambiente por la contaminación con elementos químicos.

Actualmente se dispone de amplia información sobre la concentración, movilidad y biodisponibilidad de metales en este tipo de material (CONAMA, 2001), pero no sucede lo mismo con compuestos orgánicos presentes en esta matriz.

Es por esta razón que el lodo al ser aplicado al suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser liberados, retenidos, lixiviados a través de la fase líquida del suelo, o degradados química o biológicamente. El riesgo ambiental dependerá de: la concentración de los contaminantes, su persistencia, habilidad para ser incorporados a la cadena trófica y principalmente su biotoxicidad.

Los compuestos orgánicos presentes en los biosólidos son muy diversos, dentro de los que encontramos: surfactantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), clorobencenos, compuestos orgánicos volátiles (VOCs), fenoles, dioxinas, furanos y ftalatos (Epstein, 2003).

La concentración y acumulación de compuestos orgánicos se debe al fenómeno de partición sobre los sólidos contenidos en las aguas residuales tratadas como consecuencia de la hidrofobicidad y lipofilicidad de los compuestos, teniendo como resultado un enriquecimiento en los lodos hasta varios órdenes de magnitud al comparar los valores con la concentración en las aguas que ingresan al proceso.

La materia orgánica constituye entre un 40 a 80% en peso seco de los lodos generados en las plantas de tratamiento. A esta fracción, se asocian la mayoría de los compuestos orgánicos sintéticos presentes en las aguas residuales.

Los surfactantes han sido recientemente identificados como el mayor componente antropogénico de las aguas servidas y por consiguiente de los lodos, éstos entran en las aguas limpias y residuales principalmente por descarga de residuos acuosos del lavado

doméstico e industrial de ropa y otras operaciones de limpieza. Un surfactante combina en una sola molécula, un grupo hidrófobo con uno hidrofílico, dichas moléculas tienden a agruparse en las interfases entre el medio acuoso y las otras fases del sistema, como aire, compuestos orgánicos y partículas, impartiendo por lo tanto propiedades tales como formación de espumas, emulsificación y suspensión de partículas.

El grupo hidrófobo del surfactante es por lo general un radical hidrocarburo (R) que contiene unos 10 a 20 átomos de carbono. Los grupos hidrofílicos son de dos tipos: iónicos y no iónicos. Los surfactantes iónicos se subdividen en dos categorías diferenciadas por la carga. Un ion surfactante aniónico, por ejemplo $(\text{RSO}_3)^-\text{Na}^+$ y uno catiónico como $(\text{Rme}_3\text{N})^+\text{Cl}^-$.

Los surfactantes son una importante fuente de compuestos químicos de origen sintético que pueden contaminar diversos ecosistemas. Se estimó que el consumo de surfactantes en 1998 fue de 18.000 toneladas en todo el mundo, distribuidos por un 23% de consumo en Europa, 28% en USA y Canada, 32% en Asia, 9% en Sudamérica y 8% en otras regiones (Sanz y col., 2005).

Dentro de la formulación de los diversos productos de limpieza, tanto comerciales, como industriales, la mayor cantidad se deben a una clase de surfactantes aniónicos denominados sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS) debido a sus propiedades y bajo costo de producción (García y col., 2005).

Los denominados LAS, son usados como mezclas complejas de homólogos C_{10} - C_{13} de isómeros posicionales, donde el grupo bencenosulfónico es localizado en distintas posiciones dentro de la cadena alquílica, desde el centro de la molécula hasta posiciones exteriores (Ding y Liu, 2001). Un ejemplo de éstos es el dodecibencenosulfonato lineal (C_{12} -LAS), un isómero de éstos se muestra en la Figura 1.1

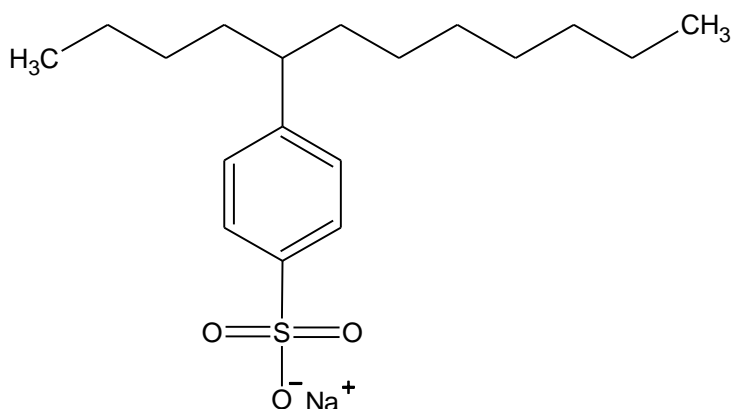


Figura 1.1-Ejemplo dodecilbencenosulfonato lineal (5)-C₁₂-LAS

La mayoría de los sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS) son biodegradados a ácido sulfofenil carboxílico (SPCs) a través de procesos aeróbicos (Ding y col.,1998), sin embargo dependiendo de las longitudes de cadena presentes prácticamente no serían degradados por el proceso anaeróbico utilizado para la estabilización de los lodos (Garcia y col., 2005). Producto de lo anterior, estos compuestos son encontrados en lodos estabilizados, en ordenes de $g\ kg^{-1}$ (Mc- Evoy y Giger, 1986; Field y col., 1992; Mortensen y col., 2001), cantidades que pueden influenciar procesos como espesado, acondicionamiento y deshidratación del lodo, incrementando el costo de producción y almacenamiento de éstos.

Por otra parte, este tipo de surfactantes pueden movilizar otros contaminantes hidrofóbicos orgánicos, mediante formación de micelas, al encontrarse en concentraciones cercanas a su concentración micelar crítica (CMC), fenómeno que puede ocurrir si el suelo es elegido como lugar de disposición (Jacobsen y col., 2004). En la Tabla 1.1 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas para LAS.

De igual forma aprovechando sus propiedades surfactantes son utilizados como remediadores ambientales para solubilizar y emulsificar contaminates orgánicos y desorber metales pesados (Kornecky y col., 1997), sin embargo, los surfactantes podrían afectar a microorganismos e invertebrados, existentes en el suelo disolviendo sus biomembranas (Jensen, 1999), a pesar de ésto se estima que los LAS no poseen un riesgo toxicológico para plantas y organismos, al ser incorporado a los suelos a través de la enmienda con biosólidos (Jensen y col., 2001).

Tabla 1.1-Propiedades fisicoquímicas para sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS).

Propiedades	Unidad	LAS
Peso molecular	g mol ⁻¹	297-339(C ₁₀ - C ₁₃)
Log K _{ow}	-	0,6 – 2,7
Solubilidad	mg L ⁻¹	35 – 90
CMC	mg L ⁻¹	100 - 1000

FUENTE: (Jacobsen y col., 2004)

El suelo es una mezcla compleja de sólidos orgánicos e inorgánicos, aire, agua y microorganismos dando como resultado una superficie altamente heterogénea, con una fuerte interacción entre todas las fases involucradas, originándose una superficie con numerosos y variados sitios activos que serían responsables de procesos de adsorción-desorción de compuestos (Sparks, 1995).

La adsorción de LAS en sedimentos es una combinación de varios mecanismos de retención tanto en la fracción orgánica como para la fracción inorgánica (Westall y col., 1999; Hand y Glen Wood, 1987), lo cual podría ocurrir en forma similar en los suelos.

Estos procesos de retención involucran, fuerzas físicas y químicas tipo Van der waals, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, y quimisorción.

La cadena alquílica lineal presente en estos compuestos es hidrofóbica y sería adsorbida por la parte no polar del suelo como la materia orgánica, por otra parte el grupo sulfonato cargado negativamente e hidrofílico interactúa con los componentes del suelo cargados positivamente o grupos polares como hidroxilos.

Por otra parte la carga negativa del grupo sulfonato podría ser repelida por cargas negativas superficiales, si el pH aumenta éstas, también se incrementarían disminuyendo por lo tanto la adsorción de LAS, no se han encontrado relaciones entre estos parámetros en los suelos, posiblemente estos procesos podrían ocurrir en forma simultánea (Sparks, 1995).

Como el principal uso que se pretende dar a los lodos de las plantas de tratamiento es la aplicación en agricultura, es importante considerar la caracterización y cuantificación

del contenido de LAS que está presente en esta matriz. Existe aun poca información sobre el real impacto de contaminación que puede tener para los suelos la presencia de estos compuestos, ésto principalmente debido a que los estudios de campo son largos y costosos.

Independientemente del uso final de los lodos, el análisis de compuestos orgánicos en general y de compuestos orgánicos persistentes en particular, supone un gran desafío a los métodos analíticos de extracción empleados.

Las investigaciones analíticas adoptadas para determinar LAS en distintas matrices es muy variada, principalmente basándose en métodos de extracción, seguido por una etapa de limpieza cromatográfica y finalmente la determinación por cromatografía de gases acoplada a detección por espectrometría de masas (GC-MS). Con el enfoque anterior se genera información cualitativa y semi-cuantitativa que permite decidir la aplicación de métodos específicos para determinar compuestos específicos o prioritarios.

Esta clase de surfactantes son compuestos no volátiles, cuya determinación analítica, depende específicamente de la matriz y el nivel de concentración en que se encuentran. Se dispone de variadas técnicas instrumentales para la identificación y cuantificación de LAS, dentro de las que podemos mencionar: cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), (Bruno y col., 2002); cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector de fluorescencia, (Mortensen y col., 2001 ; Jacobsen y col., 2004) utilizada para suelos enmendados con biosólidos, electroforesis capilar (CE), (Ding y Liu, 2001) utilizada para muestras de aguas.

Otras determinaciones de LAS utilizan espectrofotometría de absorción molecular UV-visible, a través de la formación de pares iónicos, con azul de metileno (SAAM), método que ha sido utilizado en muestras de agua (Koga y col., 1999) y aplicada a suelos (Kornecki y col., 1997). Reacción que se muestra en la Figura 1.2 (Koga y col., 1999).

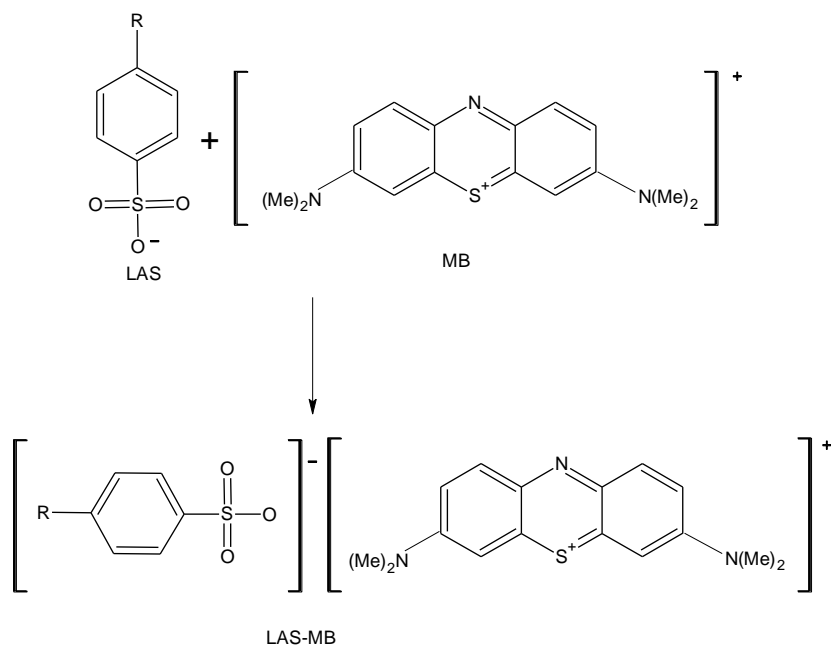


Figura 1.2-Reacción LAS y azul de metileno (MB), par-iónico (LAS-MB); formación sustancias activas mediante azul de metileno (SAAM).

Otros procedimientos derivativos utilizados ocupan también cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases utilizando como detector ionización de llama (GC-FID). Estos procedimientos derivativos incluyen formación de cloruros de sulfonilos (Mc. Evoy y col., 1986) y trifluoroetil ésteres (Trehy y col., 1990), los cuales requieren múltiples pasos preparativos, empleando gran cantidad de tiempo en la preparación de las muestras y utilizan agentes peligrosos como diazometano o pentacloruro de fosforo.

Actualmente uno de los procesos derivativos más utilizados para determinar LAS en distintas matrices es la formación de pares iónicos y posterior alquilación realizada en el inyector del cromatógrafo de gases (“injection-port”), técnica conocida como pirólisis de la sal tetraalquilamonio (TAA), basada principalmente en la reacción del grupo sulfónico presente en este tipo de surfactantes con la sal tetraalquilamonio, por ejemplo, tetrabutilamonio (TBA-H) formando un par-iónico $[RSO_3^-N(Bu)_4^+]$ en solución, que es convertida en butiléster en el inyector del cromatógrafo de gases. (Field y col., 1992 ; Ding y Chen., 1999) Figura 1.3.

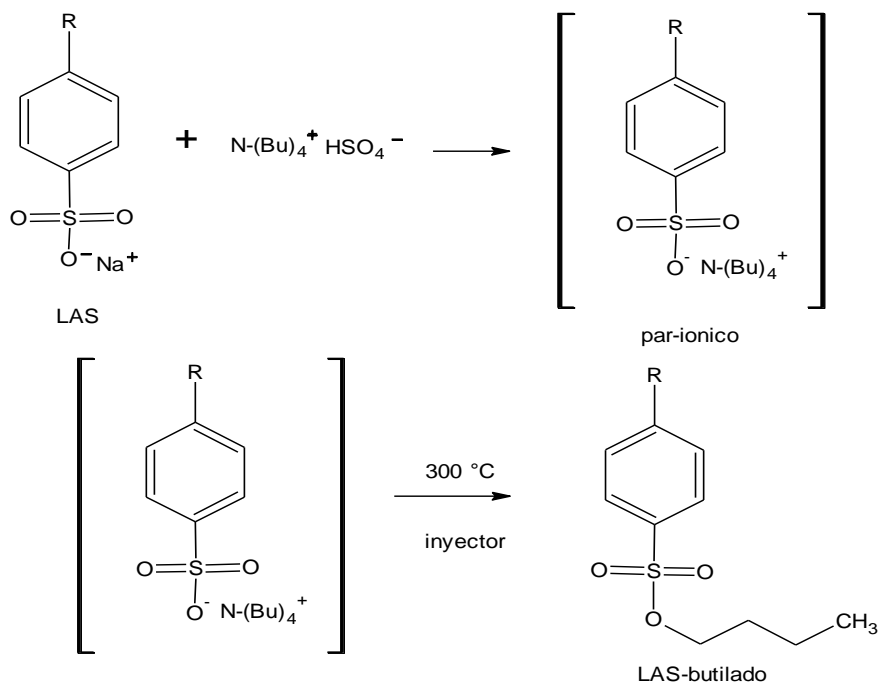


Figura 1.3-Reacción de derivatización, pirólisis del tetraalquilamonio (TAA).

Considerando la complejidad de las muestras y número de interacciones que ocurren tanto en suelo como en lodos, desde el punto de vista analítico, se establece que la etapa clave para obtener datos de calidad analítica es la extracción, la cual requiere condiciones rigurosas tanto químicas, como la elección de solventes con polaridad específica, o tratamientos energéticos como ultrasonido, microondas y utilización de solventes presurizados.

En los últimos años se ha incrementado la investigación en el desarrollo de métodos analíticos que utilicen tecnologías de extracción más eficientes y menos contaminantes.

Extracción por ultrasonido

En la extracción por ultrasonido, se aplican a la muestra vibraciones acústicas de alta frecuencia, por sobre 20 KHz. Cuando esas vibraciones son transmitidas por un líquido, ocurre el fenómeno conocido como cavitación, formación de pequeñas burbujas con presión negativa. Los compuestos químicos y las partículas son removidos mecánicamente desde la matriz, y desde los sitios de adsorción, por la onda de choque generada, cuando las burbujas colapsan por la cavitación. La implosión de las cavidades crea microambientes con alta temperatura y presión. La ocurrencia de los procesos descritos anteriormente pueden ser usados para descomponer u oxidar compuestos

orgánicos, por lo anterior, hay que tener cuidado con la ocurrencia potencial de degradación de analitos.

Extracción por microondas

El principio de operación consiste en incrementar la energía del sistema en forma directa sobre las moléculas, esto se debe a la acción de las microondas. Se produce una conducción iónica, la resistencia a este flujo genera fricción y como consecuencia se calienta la solución, además se produce un realineamiento rápido de los dipolos en el campo aplicado, esto ocurre cuando la frecuencia aplicada es de 2450 MHz, este movimiento molecular forzado genera un aumento de la temperatura del sistema y acelera el proceso de extracción desde la matriz.

Existen dos diseños básicos de equipos de extracción por microondas que son utilizados en laboratorio, éstos difieren en la forma como las microondas interactúan con la matriz, están los equipos de extracción tradicional y los equipos que focalizan las microondas sobre una pequeña región del espacio, concentrando el efecto de éstas.

Debido a la importancia que representa la extracción de este tipo de analito en la matriz de lodo y suelos enmendados, es necesario contar con métodos de análisis que permitan realizar un seguimiento en el tiempo de la presencia de contaminantes orgánicos en forma rápida, confiable y con un costo relativamente bajo.

Se ha demostrado en los estudios antes señalados que el contar con métodos rápidos, cuantitativos y de bajo consumo de solventes, especialmente solventes clorados, es un tema importante dentro de la química analítica actual. Considerando que la generación de lodos es un tema reciente en nuestro país y que la caracterización de este tipo de matriz se realiza principalmente desde un punto de vista inorgánico (metales pesados) es importante desarrollar metodologías analíticas que permitan determinar también compuestos orgánicos en esta matriz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollo y aplicación de una metodología analítica de extracción para la determinación de sulfonatos de alquilbenceno lineales (LAS), en biosólidos, suelos y suelos enmendados con biosólidos de la Región Metropolitana.

2.2 Objetivos Específicos

Optimizar una metodología de extracción de LAS en biosólidos.

Determinación de LAS en biosólidos y suelos por técnicas cromatográficas GC-MS ;GC-FID.

Realizar ensayos de incubación, de muestras de suelos enmendados con distintas dosis de biosólidos muestreados estacionalmente y evaluar la extractabilidad de LAS.

Realizar ensayos de incubación de suelos enmendados con distintas dosis de biosólidos y enriquecidos con LAS para determinar su labilidad.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Agua destilada

Metanol grado cromatográfico, Merck.

Cloroformo grado pesticida, Fisher Scientific.

Sulfato de Sodio 99% pureza, Aldrich Merck..

Nitrógeno Extrapuro 99.95% pureza, AGA.

Acetona grado cromatográfico, Merck.

Sal Sódica del ácido 4-octilbencenosulfónico 97% pureza, PM: 292,38 g mol⁻¹, (C₈-LAS), Aldrich Chemical.

Bisulfato de tetrabutilamonio 99% pureza, PM: 339,54 g mol⁻¹, C₁₆H₃₆NHO₄S tf:168-171°C, (TBA-H), Sigma-Aldrich

Estándar comercial de Sulfonatos de Alquilbenceno lineales, (LAS), 1mL = 1mg, PM: 340 g mol⁻¹, Ricca Chemical Company.

3.2 Materiales

Materiales de vidrio de uso general, volumétrico (clase A).

Embudos de decantación 50-250 mL, Duran.

Tubos de vidrio con tapas roscas teflón 10-30 mL, Pyrex N° 9826

Micro-pipetas automáticas 200-1000 μ L y 1-5 mL Boeco

Viales de vidrio esmerilados 10 ml, Supelco N° 6-9645

Viales de vidrio ámbar con tapas roscas teflón 4 mL.

Micro-jeringas GC y HPLC 10-100 μ L, Hamilton.

Mortero de ágata.

Papel filtro Advantec MFS grado N° 2.

3.3 Soluciones

Solución agente derivatizante bisulfato de tetrabutilamonio (TBA-H).

Se prepararon soluciones a distintas concentraciones de TBA-H, para lo cual se pesaron en promedio $4,2524 \pm 0,0062$ g; $2,2129 \pm 0,0082$ g; $2,5572 \pm 0,0020$ g; $0,1702 \pm 0,0009$ g, se disolvieron en metanol y se completó a 25 mL, obteniendo soluciones de 0,50M; 0,26M; 0,30M y 0,02M respectivamente. Las soluciones se almacenaron a 4°C en ausencia de luz.

Solución de sal sódica del ácido 4-octilbencenosulfónico (C₈-LAS).

Se prepararon soluciones de concentración, 500 y 1000 mg L⁻¹. Para ello se pesaron en promedio $0,0125 \pm 0,0001\text{g}$ y $0,0253 \pm 0,0004\text{g}$, respectivamente los cuales son disueltos en agua destilada y llevadas a matraces de aforo de 25 mL. Las soluciones se almacenaron a 4°C en ausencia de luz.

3.4 Equipo Menor

Balanza Analítica 125 A ($\pm 0,0001\text{g}$) Precisa.

Balanza granataria PJ Junior 500 C ($\pm 0,01\text{g}$) Precisa.

Centrífuga Heraeus Sepatech modelo Varifuge.

Agitador recíproco Heidolph modelo Promax.

Baño ultrasonido Transonic 310 ELMA 50/60 Hz.

Autovortex Mixer Vision S.A KMC-1300V SA5.

Estufas de secado WTE Binder.

Incubador Gallenkamps.

3.5 Equipo Mayor

Cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS), Shimadzu modelo QP5050 /GC17-A.

Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), Hewlett-Packard modelo 5890 serie II .

Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) con inyector programable, Varian modelo 3800 serie 1236.

Columnas capilares DB-1(MS) (25m, 0.25mm ID, 0.25 μm df); DB-5 (30m, 0.25mm ID, 0.25 df), HP-5 (30m, 0.32 ID, 0.25 μm df).

3.6 Descripción de muestras utilizadas

3.6.1 Biosólidos

Para el estudio fueron utilizados biosólidos provenientes de una planta de tratamiento de aguas servidas de la Región Metropolitana, designados como BET2004 y BET2005, de acuerdo al año y el mes en que fueron dispuestos en el monorrelleno. Los biosólidos fueron muestreados durante el año 2005 en los meses de septiembre y abril respectivamente.

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en bolsas de polietileno, secadas, tamizadas a 2 mm y almacenadas en frascos de polietileno a temperatura ambiente.

Características químicas de los biosólidos

Los biosólidos utilizados en esta investigación se encuentran caracterizados mediante metodologías analíticas estandarizadas (Sadzawka y col.,2004) se consideraron los siguientes parámetros pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), conductividad eléctrica (CE), y contenido de materia orgánica (MO). La caracterización fue realizada en la facultad de Ciencias Agronómicas por Sagredo, (2006).Tabla 3.1

Tabla 3.1-Características químicas de los biosólidos utilizados

Análisis	Unidad	BET2004	BET2005
MO TOTAL (360°C)	%	43,8	43,4
MO OXIDABLE	%	41,5	40,4
pH - H ₂ O	-	6,5	6,4
pH - KCl	-	6,4	6,1
CIC - pH 7	cmol kg ⁻¹	47,2	49,9
CE (1:5)	dS m ⁻¹	2,12	8,10

3.6.2 Suelos

Se seleccionaron para el estudio cuatro suelos agrícolas de la Región Metropolitana del orden Mollisol, identificados como El Maiten (EM), La Paloma (LP), Miraflores (M) y Coyuncavi Bajo (CB). Todas las muestras fueron obtenidas desde 0 hasta 20 cm de profundidad del nivel superficial, trasladadas al laboratorio en bolsas de polietileno, secadas, tamizadas con tamiz plástico de 2mm y almacenadas a temperatura ambiente en frascos de polietileno de alta densidad.

Tabla 3.2-Ubicación y clasificación de los suelos

Suelos	Ubicación	Coordenadas	UTM*	Serie**	Orden**
EM	Lampa	33° 19' 902''	6.310,338		
	Camino			Lampa	Mollisol
	Lipangue				
	RM	70° 51' 873''	326,464		
LP	Lampa	33° 19' 909''	6.310,361		
	Camino			Lampa	Mollisol
	Lipangue				
	RM	70° 52' 367''	325,398		
M	Curacavi	33° 24' 418''	6.301,663		
	Miraflores			Chorombo	Mollisol
	RM	71° 04' 745''	306,661		
CB	Curacavi	33° 23' 158''	6.303,918		
	Coyuncavi bajo			Pomaire	Mollisol
	RM	71° 07' 126''	302,922		

* coordenadas en Km de latitud Sur y longitud Oeste respectivamente.** FUENTE: CIREN

Tabla 3.3-Textura de los suelos utilizados

Suelo	% Arena	% Arcilla	% Limo	Textura
EM	62	17	21	Franco-Arenoso
LP	88	8	4	Arenoso
M	63	21	16	Franco-Arcilloso-Arenoso
CB	71	16	13	Franco-Arenoso

Caracterización química de los Suelos

Los cuatro suelos utilizados se encuentran caracterizados mediante metodologías analíticas estandarizadas (Sadzawka y col,2004) se consideraron los siguientes parámetros: pH, capacidad de intercambio cationico (CIC), conductividad eléctrica (CE), contenido de materia orgánica (MO), La caracterización fue realizada en la facultad de Ciencias Agronómicas por Sagredo, (2006).Tabla 3.4

Tabla 3.4-Características químicas de los suelos EM, LP, M, CB.

Análisis	Unidad	EM	LP	M	CB
MO TOTAL(360° C)	%	7,5	2,1	5,0	4,6
MO OXIDABLE	%	4,7	1,2	3,8	3,9
pH - H ₂ O	-	7,91	6,69	6,42	7,18
pH - KCl	-	7,68	6,38	6,09	6,52
CIC - pH 7	cmol kg ⁻¹	23	5,0	14	11
CE (1:5)	dS m ⁻¹	0,322	0,085	0,202	0,087
FeO _X (AMORFO)	g 100 g ⁻¹	0,117	0,434	0,231	0,158
MnO _X (AMORFO)	g 100 g ⁻¹	0,017	0,018	0,053	0,055
FeO _X (CRISTALINO)	g 100 g ⁻¹	0,405	0,133	0,199	0,202
MnO _X (CRISTALINO)	g 100 g ⁻¹	0,030	0,023	0,062	0,064

MO_x = Oxidos

3.7 Ensayos de Incubación de muestras.

Las muestras de suelo con los distintos tratamientos (suelo control, suelo enriquecido con LAS, suelo enriquecido con LAS y tratado con biosólido), se incubaron en forma paralela en incubador Gallenkamps, por 30 días a 25 ± 1 °C en condiciones de capacidad de campo. Se utilizaron para el estudio bolsas plásticas de polietileno mantenidas semi-cerradas .

El régimen de capacidad de campo se controló a través del registro periódico de su peso, reponiendo la pérdida, con agua destilada manteniendo el sistema en forma disgregada.

3.7.1 Enriquecimiento de las muestras de suelo con LAS

A 10 g de suelos colocados en dos cápsulas de vidrio, se agregaron 2 mL y 10 mL de la mezcla estándar acuosa de LAS, correspondiente a 0,2 y 1,0 g kg⁻¹ respectivamente de LAS.

Para lograr inmovilizar e incorporar los compuestos a la matriz se agitaron y secaron las muestras 40 °C, para luego molerlas en un mortero de ágata.

3.7.2 Suelo tratado con biosólido y enriquecido con LAS

Se tomaron aproximadamente 10 g de cada suelo y se procedió a realizar la mezcla con el biosólido escogido (BET2005), ocupando como dosis 30 Mg ha⁻¹ en base seca, la mezcla resultante fue homogeneizada para posteriormente enriquecerla con 10 mL de la mezcla estándar de LAS 1,0 g kg⁻¹, y proceder como en [3.7.1].

3.7.3 Suelo tratado con biosólido

Se tomaron aproximadamente 10 g de cada suelo y se procedió a realizar la mezcla con el biosólido escogido (BET2005), en una dosis de 30 Mg ha⁻¹ de biosólido en base seca.

3.8 MÉTODOS

3.8.1 Estudio de la reacción de derivatización de LAS.

Se realizaron pruebas para confirmar la formación del par-iónico según lo descrito por Field y col., (1992) utilizando bisulfato de tetrabutilamonio (TBA-H) como agente derivatizante y posterior extracción con un solvente orgánico, para finalmente lograr la esterificación en el inyector y ser analizados mediante cromatografía de gases (Ding y col.,1999).

Derivatización en matrices acuosas.

Para confirmar la reacción propuesta por Field y col., (1992), se realizaron una serie de pruebas. Se utilizó un estándar de LAS 1mg = 1 mL, de la cual no se tiene información acerca de las cadenas alquílicas presentes en la mezcla y proporción en la que se encuentran.

En un tubo de vidrio de 30 mL se agregan 1 mL de solución estándar de LAS y 1 mL de H₂O destilada, a la solución resultante se le adicionaron 0,5 mL de TBA-H 0,50 M y se agitó por 5 minutos a temperatura ambiente, para luego ser extraída tres veces con CHCl₃ en un embudo de decantación de 50 mL, ocupando para cada extracción 2 mL de solvente, agitando 30 seg. Los extractos orgánicos fueron reunidos y secados con Na₂SO₄ anhidro por 1 hora, se filtraron y su volumen fue reducido a 1 mL utilizando N₂.

El extracto obtenido fue analizado mediante GC-FID en condiciones descritas por

Field y col., (1992).

Condiciones cromatográficas GC-FID

Para evaluar la formación de los pares iónicos y alquilación de la mezcla estándar de LAS, se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 serie2, GC-FID en las siguientes condiciones:

Columna capilar: HP-5

Temperatura del inyector : 300 °C

Modo de inyección : split (1: 10).

Presión en la cabeza de la columna: 15 psi

Temperatura del detector : 280 °C

Gas portador: N₂

Volumen de inyección : 1 μL

Programa térmico

Tabla 3.5 Programa térmico utilizado

Temp. [°C]	Rampa [°C/min]	Tiempo Isoterm. [min]	Tiempo total [min]
110		0	0
220	10	0	11
300	6	3	27.33

Derivatización de la sal sódica del ácido 4- octilbencenosulfónico (C₈-LAS).

Desde las soluciones de C₈-LAS de 500 y 1000 mg L⁻¹ se tomaron alícuotas de 1 mL y fueron llevadas a tubos de reacción de 30 mL, a los cuales se les adicionó 1 mL de H₂O y 0,5 mL de TBA-H 0,50 M, las soluciones resultantes fueron agitadas por 5 minutos y extraídas con CHCl₃ en embudos de decantación de 50 mL con tres porciones de 2 mL agitando por 30 segundos, los extractos orgánicos fueron reunidos y secados con Na₂SO₄ anhidro filtrados y llevados a un volumen de 0,5 mL para ser analizados por GC-FID.

3.8.2 Evaluación de parámetros en la reacción

Con la finalidad de tener más antecedentes sobre la reacción derivativa propuesta y poder aplicarla a extractos acuosos (Ding y col.,1999) provenientes de biosólidos y suelos, se estudiaron algunos factores que podrían afectar la formación del par-iónico y extracción de los compuestos desde matrices acuosas.

Efecto de la temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura en la formación del par-iónico, esta se realizó a temperatura ambiente y a 80°C ocupando baño de agua.

Tiempo de agitación

Se estudió la reacción a tres tiempos distintos 30 seg , 1 min y 5 min

Concentración de TBA-H

Se estudió el efecto de la concentración del reactivo derivatizante en la reacción, y para ello se emplearon dos concentraciones 0,020 M y 0,50 M de TBA-H

Extractantes

Se estudió lograr mejorar la extracción, realizando pruebas con hexano y CH₂Cl₂.

Extracción mediante la aplicación de ultrasonido

Se evaluó el proceso de extracción líquido-líquido aplicando ultrasonido a distintos tiempos 5 y 30 min.

3.8.3 Extracción con solvente método convencional para lodos

Se pesaron 100 mg de BET2005 en tubos de reacción de 30 mL a los cuales se les adicionó 5 mL de TBA-H 0,02 M. Las mezclas fueron sonicadas por 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, se decantó el sobrenadante. Las muestras fueron extraídas tres veces ocupando nuevas porciones de TBA-H en cada extracción, los extractos fueron combinados y concentrados a 0,5 mL para análisis por GC-FID. (Field y col., 1992).

3.8.4 Extracción acuosa desde matriz sólida

Se comparó el método convencional (Field y col., 1992) de extracción sólido-líquido con la extracción acuosa desde el biosólido.

Se pesaron 100 mg de BET2005, se llevaron a tubos de reacción de 15 mL, se les adicionó 2 mL de H₂O destilada, se agitaron por 5 minutos y sometieron a ultrasonido por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugaron por 20 minutos a 3000 rpm. Finalmente el extracto acuoso fue separado y derivatizado mediante procedimiento descrito anteriormente, para ser analizados por GC-MS y GC-FID.

3.8.5 Método propuesto

Se pesaron 100 mg de BET2005 los cuales se llevaron a tubos de reacción de 10 mL, se adicionó 3 mL de H₂O destilada y 0,5 mL de TBA-H 0,50 M, la mezcla resultante fue agitada por 1 minuto. Posteriormente se agregaron 2 mL de CHCl₃, la mezcla heterogénea formada, fue sometida a ultrasonido por 30 minutos y posteriormente fue centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm. La fase orgánica fue separada de la fase acuosa y filtrada lavando, arrastrando posibles pérdidas con porciones pequeñas de CHCl₃. El extracto orgánico fue secado con Na₂SO₄ anhidro, se agregaron 100 µL de C₈-LAS derivatizado, como estándar interno y se evaporó a un volumen de 0,5 mL para ser almacenados en viales ámbar de 4 mL y confirmados mediante GC-MS y GC-FID.

Condiciones cromatográficas GC-MS

La identificación de las distintas familias de LAS en el estándar y muestras se realizó a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), Shimadzu modelo QP5050/GC17-A, se utilizó el programa térmico [Tabla 3.5], en las siguientes condiciones experimentales.

Columna capilar: DB-1

Temperatura del inyector : 300 °C

Modo de inyección : split (1: 30).

Flujo columna : 1 mL min⁻¹

Velocidad lineal : 40,9 cm seg⁻¹

Solvent delay : 4 min

Gas portador: He

Volumen de inyección : 2 µL

Fuente cuádruplo: 280°C

3.8.6 Estudio del efecto de factores relacionados con la eficiencia de la reacción y la extracción de la muestra.

Luego de haber identificado los factores significativos basados en los estudios preliminares de la reacción, se estudiaron los factores relacionados con la extracción a través de la metodología modificada propuesta con la finalidad de disminuir tiempo de preparación de la muestra y lograr la optimización y ser aplicada a todas las muestras.

Para ésto se realizó un diseño experimental multivariado, que contempló dos factores: concentración del agente derivatizante TBA-H y tiempo de ultrasonido. Los factores consideraron 3 niveles ocupando el modelo factorial (3^2), más tres centros adicionales, completando un total de 12 experimentos en duplicado para estimar el error experimental.

Optimización de la Extracción

Para determinar las condiciones óptimas de extracción se utilizaron muestras de biosólido (BET2005), y el método modificado de extracción [3.8.6]. El análisis de varianza y el diseño factorial fue realizado con el software Statgraphics 4.1

Tabla 3.6-Factores y niveles utilizados para el estudio que afectarían la eficiencia en la extracción

	Nivel		
Factor	-1	0	1
Concentración TBA-H [M]	0,02	0,26	0,5
Tiempo ultrasonido [min]	5	23	40

La matriz de diseño experimental, entregada por el programa utilizado, donde se muestra la combinación de los factores estudiados al nivel menor, central y mayor se presenta en la Tabla 3.7

Tabla 3.7-Matriz del diseño experimental ocupada (3^2), mas tres centros

Experimento	Conc TBA-H [M]	Tiempo ultrasonido [min]
1	0	0
2	1	-1
3	1	0
4	1	1
5	-1	0
6	0	1
7	-1	-1
8	-1	1
9	0	-1
10	0	0
11	0	0
12	0	0

3.8.7 Derivatización del estándar interno C₈-LAS

De la solución de C₈-LAS de 1000 mg L⁻¹ [3.3], se midieron 6 mL y se llevó a un matraz erlenmeyer de 100 mL aplicando agitación magnética, se adicionaron 12 mL de H₂O destilada y 3 mL de TBA-H 0,30 M, manteniendo la agitación por aproximadamente 3 minutos; luego a la mezcla se le agregó lentamente 12 mL de CHCl₃, manteniendo la agitación. La mezcla bifásica formada es trasladada a un embudo de decantación de 50 mL, y agitada por 30 segundos, la fase orgánica es separada y secada con Na₂SO₄ anhidro y evaporada a un volumen de 3 mL para obtener una concentración de 2000 mg L⁻¹.

3.8.8 Metodología optimizada

La metodología modificada fue optimizada con la finalidad de tener las mejores condiciones para la determinación de LAS, y para ser aplicada a todas las muestras.

Se pesaron 100 mg de muestra, se llevaron a tubos de reacción de 10 mL, se adicionó 3 mL de H₂O destilada y 0,5 mL de TBA-H 0,30 M, la mezcla resultante fue agitada por 1 minuto, posteriormente se adicionaron 2 mL de CHCl₃. La mezcla formada en el tubo de reacción, fue sonicada por 23 minutos y luego fue centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm. La fase orgánica fue separada de la fase acuosa y filtrada lavando y arrastrando posibles pérdidas con porciones pequeñas de CHCl₃, el extracto orgánico fue secado con Na₂SO₄ anhidro, luego se agregaron 100 µL de C₈-LAS derivatizado [3.8.7], como estándar interno (concentración en la muestra de 400 mg L⁻¹), se evaporó a un volumen de 0,5 mL y fue almacenado en viales ámbar de 4 mL y cuantificados por GC-FID.

3.8.9 Condiciones cromatográficas optimizadas GC-FID

Se mejoraron las condiciones cromatográficas cambiando de cromatógrafo de gases a Varian modelo 3800 serie 1236 y a modalidad de flujo de columna constante para lograr tiempos de retención menores, manteniéndose el programa térmico [Tabla 3.5].

Columna capilar: DB-5

Temperatura del inyector : 300 °C

Modo de inyección : split (1: 7).

Flujo columna : 2,8 mL min⁻¹.

Temperatura del detector : 280 °C

Gas portador: He

Volumen de inyección : 2 µL

3.8.10 Validación del Método Analítico

Se determinaron los parámetros de calidad analítica del método propuesto, mediante el desarrollo de curvas de calibración en condiciones óptimas.

Para la determinación de la precisión del método propuesto, se calculó el coeficiente de variación (CV) evaluando la repetibilidad.

El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método, se determinaron en un rango de 250 a 1000 mg L⁻¹, obteniéndose los parámetros en forma estadística, ya que en este caso no tenemos señal medible para el blanco cromatográfico. La aproximación estadística utilizada fue la que se muestra en las siguientes ecuaciones, donde y_b representa la señal del blanco y S_b la desviación estándar del blanco, lo cual lo relacionamos con nuestra ecuación de regresión de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} Y &= bX + a & \text{LOD} &= y_b + 3S_b \\ y_b + 3S_b &= bX + a \\ y_b &= a \quad ; \quad S_b = S_{y,x} \\ X &= 3 (S_{y,x} / b) = \text{LOD} \end{aligned}$$

$$\text{LOD} = 3 (S_{y,x} / b)$$

Una suposición del método de los mínimos cuadrados no ponderados es que cada punto en la representación gráfica tiene una variación distribuida normalmente con una desviación estándar estimada $S_{y,x}$, también conocida como error estándar, que se refiere

a la medida de desviación de los datos con respecto a la línea de regresión (Miller, 2002), es por tanto adecuado utilizar $S_{y,x}$ en lugar de S_b en la estimación del límite de detección.

El valor de a , la ordenada en el origen calculada, se puede utilizar como una estimación de y_b . La sensibilidad de una técnica se define correctamente como la pendiente de la recta de calibración. Por el contrario, el límite de detección de un método se calcula con la ayuda prestada por la zona de la representación cercana la origen, y utiliza tanto la pendiente b como la ordenada en el origen. Para el cálculo del LOQ se cambia el factor 3 por 10. Para la preparación de las curvas de calibración se tomaron distintas alícuotas de la mezcla de LAS (1 mg = 1 ml): 125 μ L, 250 μ L, 375 μ L, 500 μ L, 1,0 mL, 1,5 mL y 2,0 mL y fueron llevadas a tubos de reacción de 10 mL, completando a un volumen de 3,0 mL con H₂O destilada, a las soluciones se les adicionaron 0,5 mL de TBA-H 0.30M. Las soluciones fueron agitadas en Vortex por 1 minuto, a la mezcla se le adicionó 2,0 mL de CHCl₃. La mezcla heterogénea fue agitada nuevamente por 5 segundos para ser llevadas, a un baño de ultrasonido a temperatura ambiente por 23 minutos, la mezcla bifásica fue centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos y finalmente las fases fueron separadas. la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y evaporada con N₂ a un volumen de 0,5 mL, para ser almacenada en un vial ámbar de 4 mL y refrigeradas hasta su análisis por GC-FID.

El estudio de la exactitud del método analítico se llevó a cabo, mediante pruebas de recuperación de los compuestos en cuestión, desde matrices enriquecidas.

Para el estudio se ocuparon los biosólidos (BET2004 y BET2005) enriquecidos con 3 g kg⁻¹ y 7 g kg⁻¹. Para el procedimiento de enriquecimiento de los biosólidos se pesó 1,00 g de los biosólidos y se adicionaron 3,0 mL y 7,0 mL del estándar de LAS, se inmovilizaron los compuestos agitando constantemente y dejando secar a 40°C en estufa por 4 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Derivatización - Ensayos preliminares.

Se aplicó el método de derivatización propuesto por Field y col., (1992); Ding y col., (1999). Los compuestos derivatizados se determinaron mediante cromatografía de gases, utilizando la mezcla estándar de LAS.

Los extractos orgánicos obtenidos, se inyectaron a modo razón de split (1:10) obteniendo los cromatogramas correspondientes, que dieron como resultado un perfil de once picos cromatográficos medianamente definidos en la zona, entre los 20 a 25 minutos con sus respectivas áreas, evidenciando la presencia de la reacción derivativa descrita bajo estas condiciones.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1

N° Picos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tiempo Retención [min.]	21.20	21.36	21.76	22.39	22.62	23.05	23.58	23.68	23.88	24.32	24.99
Área	3974	4233	3996	16089	5843	5998	3246	10215	3491	3377	5227

Tabla 4.1-Pruebas preliminares para el estándar de LAS-butilado 2000 [mg L⁻¹].

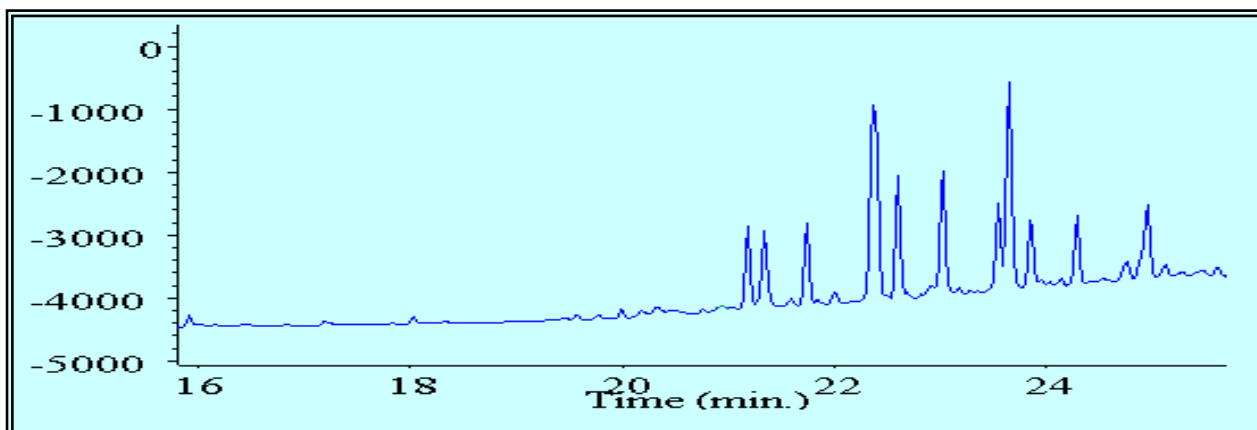


Figura 4.1-Cromatograma del estándar de LAS-butilado 2000 [mg L⁻¹].

Se realizaron pruebas para el procedimiento de derivatización de la sal sódica del ácido 4-octilbencenosulfónico (C₈-LAS), para evaluar tiempo de retención de este sulfonato de alquilbenceno lineal con cho átomos de carbono, el cual se utilizaría como estándar interno. Para ello se aplicó la metodología descrita en [3.8.1] a las soluciones de 500 y 1000 mg L⁻¹. Los extractos orgánicos obtenidos después del proceso, fueron inyectados en GC-FID en las mismas condiciones anteriores descritas, obteniendo un pico cromatográfico bien definido, anterior a la zona en que encontramos las once señales de la mezcla estándar de LAS.

En ambos casos las muestras fueron inyectadas en duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en Tabla 4.2.

Tabla 4.2-Tiempos de retención y áreas de C₈-LAS butilado para dos concentraciones 500 y 1000 [mg L⁻¹]

Concentración C ₈ -LAS [mg L ⁻¹]	500	1000
Tiempo retención (min,)	20.97	20.95
Área	90509	155552

4.2 Evaluación de la reacción de derivatización

4.2.1 Efecto de la Temperatura

Para evaluar el efecto de la temperatura en la formación del par-iónico se realizó la reacción a 80°C, a través de la metodología [3.8.1]. No se observaron grandes cambios en las señales. Lo observado, corrobora lo que manifiesta Field y col., (1992), que la alquilación de sulfonatos de cadenas largas se logra a altas temperaturas en el inyector del cromatografo y la primera etapa sería la formación de una sal en la cual la temperatura no tendría importancia.

4.2.2 Efecto del tiempo de agitación

Se encontró que el tiempo de agitación de un minuto fue suficiente para la formación del par-iónico, ya que al efectuar la agitación en un tiempo de 30 segundos se obtuvo áreas menores y al agitar por 5 minutos, las señales fueron similares a las obtenidas cuando se agitó por un minuto.

4.2.3 Efecto de la concentración de TBA-H

Se utilizaron dos concentraciones del agente derivatizante, 0,02 M y 0,50 M, encontrándose que esta última fue la más indicada. Por tanto éste, debería ser un factor a considerar al aplicar la reacción a muestras reales.

4.2.4 Efecto de agentes extractantes

Para optimizar la extracción líquido-líquido con CHCl_3 , se probaron otros dos extractantes CH_2Cl_2 y hexano, para evaluar la extracción cambiando la polaridad del extractante, obteniendo en ambos casos resultados negativos, no observando el perfil de señales mostrado en las pruebas anteriores realizadas con CHCl_3 . Por lo tanto, este solvente sería el más adecuado para realizar la extracción.

4.2.5 Efecto de la radiación de ultrasonido

Para mejorar la extracción líquido-líquido utilizada mediante embudo de decantación, se realizaron pruebas aplicando 5 y 30 minutos de ultrasonido en un tubo de reacción, para disminuir volumen de solvente y tiempo. Los resultados son parcialmente favorables en el tiempo de realización y volumen de extractante.

En la aplicación del método con ultrasonido se necesitaron sólo 2 mL y para la extracción convencional ocupando embudos de decantación, 6 mL, también en las pruebas de extracción líquido-líquido convencional se observó la formación de pequeñas emulsiones, lo que podría producir pérdidas.

La extracción utilizando ultrasonido y luego centrifugación fue mas efectiva que la que utilizó embudo de decantación, ya que se obtuvo señales con áreas relativamente mayores, con un menor consumo de solvente.

4.3 Extracción convencional en muestras de biosólidos

Se realizaron pruebas de extracción convencional para la determinación de LAS en biosólidos de la Región Metropolitana, utilizando la metodología [3.8.3] obteniendo una gran cantidad de señales en tiempos de retención similares a los tiempos obtenidos para el estándar de la mezcla de LAS, sin embargo, por encontrarse este extracto en metanol no podríamos confirmar si corresponden a nuestros compuestos en cuestión Tabla 4.3

Nº Picos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tiempo Retención [min.]	21,26	21,40	21,81	22,07	22,46	22,67	23,09	23,62	23,72	23,93	24,37
Área	2848	1993	1103	2601	11623	4849	5720	5577	10771	5636	5146
Nº Picos	12	13	14	15	16	17	18				
Tiempo Retención [min.]	24,85	24,96	25,04	25,20	25,57	25,70	25,92				
Área	6529	2554	2295	3347	13743	1832	5839				

Tabla 4.3-Extracción convencional de biosólidos (BET2005) empleando metanol y determinación por GC-FID.

4.4 Extracción acuosa en muestras de biosólido

Se realizaron extracciones acuosas para BET2005 a través de agitación y ultrasonido, al extracto separado de la muestra se aplicó el proceso derivativo con el fin de comparar, la extracción acuosa y la metodología modificada propuesta en esta memoria. Se determinó la identidad de estos compuestos mediante GC-MS en comparación con estándares en las mismas condiciones.

4.5 Comparación de la extracción acuosa y metodología propuesta

Se comprobó la existencia de LAS en biosólidos, relacionando los tiempos de retención y áreas entre la mezcla estándar de LAS y los extractos obtenidos de BET2005 utilizando GC-MS.

Se utilizó el procedimiento propuesto [3.8.5], donde se realizó la extracción sólido-líquido y derivatización in-situ. Se observó un aumento en la magnitud de las áreas en comparación de lo obtenido al realizar una extracción acuosa, previa al proceso derivativo (Tabla 4.4).

Tabla 4.4-Comparación de resultados obtenidos de la extracción acuosa y el método propuesto en muestra de biosólido BET2005 GC-MS. * Estándar interno C₈-LAS.

Estandar LAS-butilado 2000 [mgL ⁻¹]			Extracción acuosa		Método propuesto	
Nro picos	T. Ret [min]	Areas	T. Ret [min]	Areas	T. Ret [min]	Áreas
1*	16.02*	99567975	16.01*	99782316	16.00*	99663890
2	16.36	28068104	16.36	4861214	16.39	4350860
3	16.49	27813996	16.48	2956056	16.51	3721712
4	16.82	30792493	16.83	3205054	16.85	5575134
5	17.36	50576616	17.36	791094	17.39	2477924
6	17.48	102818773	17.48	13319569	17.5	67382208
7	17.65	78075720	17.65	6809471	17.68	41885090
8	18.01	59236469	18.00	4515304	18.04	37690256
9	18.57	143898050	18.55	19525740	18.6	141509540
10	18.64	51784523	18.63	7896184	18.67	92150157
11	18.83	54878605	18.82	5213215	18.86	69253240
12	19.19	33397805	19.18	5095552	19.22	614592293
13	19.77	56057810	19.76	5280708	19.74	124752547

4.6 Determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para identificar los compuestos presentes tanto en la mezcla estándar de LAS, como en los extractos orgánicos provenientes de un biosólido de la Región Metropolitana BET2005, se utilizó GC(EI)-MS, realizando un barrido completo (SCAN) de 50 a 400 UMA, ocupando las condiciones cromatográficas descritas en [3.8.5] y el mismo programa térmico Tabla [3.5] obteniendo los respectivos cromatogramas Figuras 4.2 y 4.3 y espectros de masas.

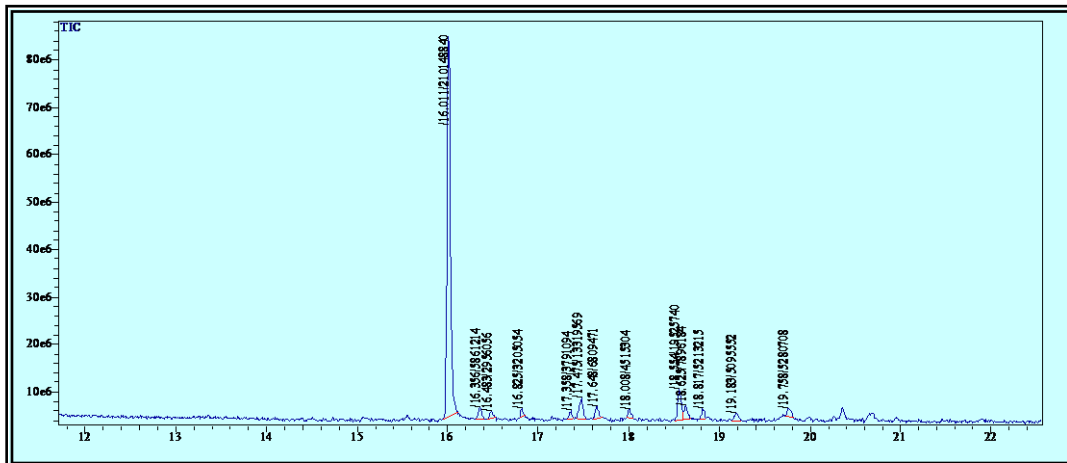


Figura 4.2-Cromatograma de una muestra de biosólido BET2005, empleando extracción acuosa y derivatización, mediante GC-MS.

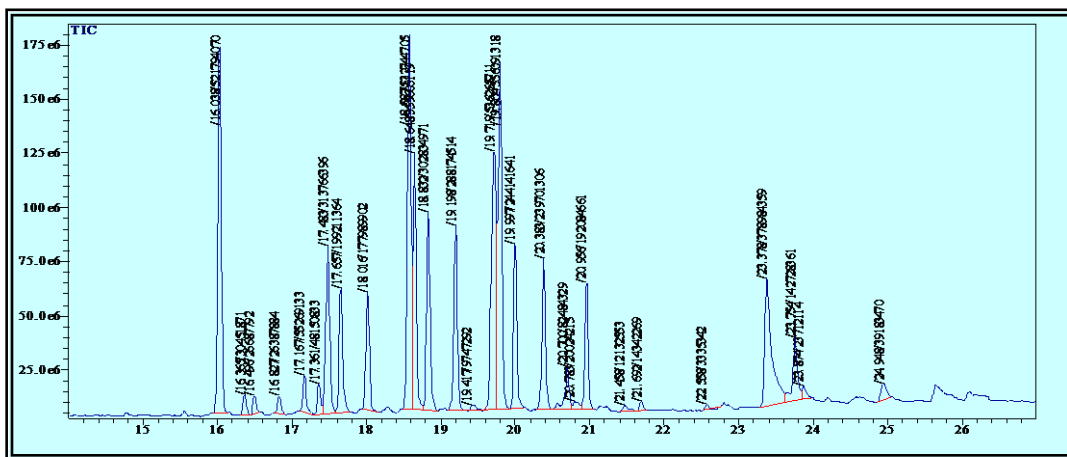


Figura 4.3-Cromatograma de una muestra de biosólido BET2005, empleando metodología modificada, mediante GC-MS.

4.6.1 Interpretación de espectros de masas

Se obtuvieron los respectivos espectros de masas para el estándar interno, mezcla estándar de LAS y de los extractos orgánicos del biosólido a modo de confirmar la identidad de estos compuestos y sus distintas familias isoméricas. Se han informado familias entre de 10-13 átomos de carbono, (Field y col., 1992 ,Ding y col., 1999), para estándares comerciales de LAS.

El espectro de masas del C₈-LAS butilado, nos entregó información para determinar la composición de la mezcla estándar de LAS, y de los compuestos presentes en los lodos ya que presentó los iones característicos de naturaleza aromática típicos como, m/z 91 (ion tropilio); m/z 171; m/z 185 que corresponderían a C₂H_{2n}C₆H₄SO₃H, donde n = 1 o 2. Para la identificación del largo de la cadena se ocuparía [M-55]⁺, que correspondería a la pérdida del fragmento C₄H₇, confirmando la esterificación del compuesto, para este caso m/z 271.

Estos antecedentes fueron utilizados para determinar los distintos largos de cadenas existentes en la mezcla estándar, interpretando los espectros de masa para todas las señales. Obteniendo el registro total de iones (TIC), podemos observar la presencia de largos de cadena en la mezcla, que irían de cadenas desde 10 átomos de carbono hasta 12, utilizando también [M-55]⁺, iones m/z 299 para C₁₀-LAS; m/z 313 para C₁₁-LAS y m/z 327 para C₁₂-LAS, para confirmar butilación (Figura 4.4) y iones m/z = 91,171 y 185 para confirmar naturaleza aromática.

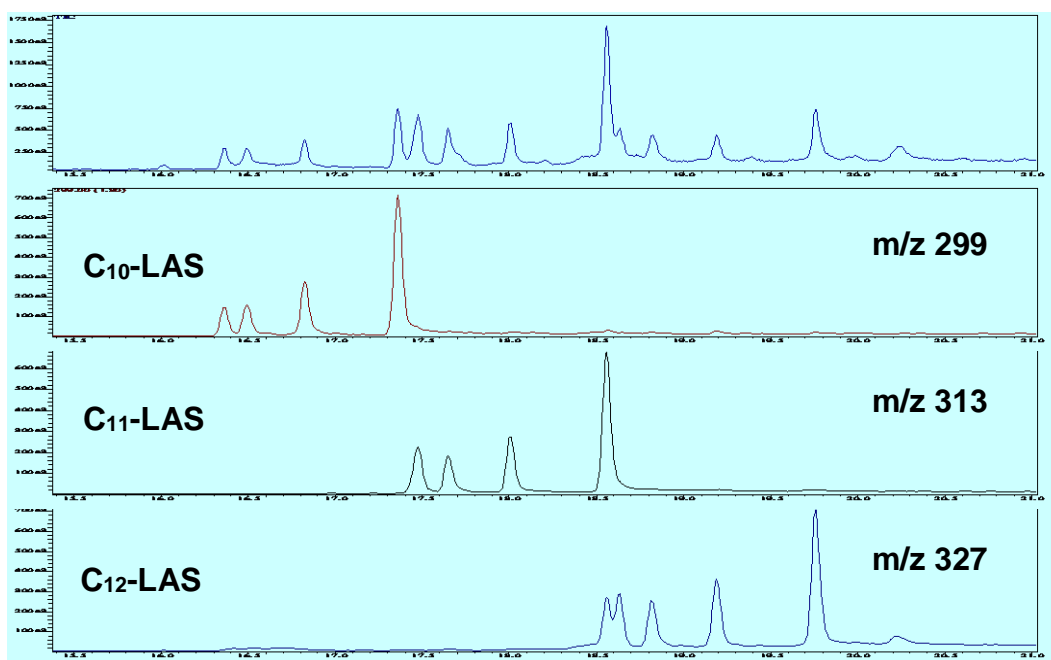


Figura 4.4-Cromatograma de la mezcla estándar de LAS butilado de 2000 [mg L⁻¹], en modalidad SCAN (TIC) ; m/z = 299,313 y 327 que confirmaría la presencia de familias C₁₀-LAS; C₁₁-LAS y C₁₂-LAS respectivamente

Se observó en la muestra estándar (Figura 4.4), la presencia de tres familias de isómeros que van de 10 átomos de carbono hasta 12. Para identificar los distintos isómeros presentes en la mezcla estándar, se analizaron las abundancias relativas y los distintos iones registrados para cada compuesto. Por ejemplo para identificar (4)-fenil- C_{10} -LAS se determinó el largo de la cadena por $[M-55]^+$, como se mencionó anteriormente por pérdida del fragmento C_4H_7 . La posición en que se encontraría el grupo benceno sulfónico en la cadena alquílica lineal (en este caso posición 4), se determinó por el registro de los iones m/z 213 y ion 255, que corresponderían a los segmentos de las cadenas alquílicas $[M-55-C_6H_{13}]^+$ y el fragmento $[M-55-C_3H_7]^+$ respectivamente (Figuras 4.5 y 4.6). La abundancia relativa de ambos iones dependería de la estabilidad del fragmento registrado, que se encontraría relacionado con el número de carbonos, así los segmentos con menores unidades de carbono serían más estables, lo que aumentaría su abundancia relativa.

De manera similar se identificó la posición del grupo benceno sulfónico en las tres familias existentes en la mezcla. El resumen de lo obtenido lo muestra la Figura 4.5, donde los números significan la posición del grupo benceno sulfónico en la cadena. Se podría decir que los isómeros localizados en el medio de la cadena alquílica, denominados isómeros internos eluyen primero que los isómeros donde el grupo benceno sulfónico se encuentra al final (isómeros externos), lo cual podría explicar la disminución de la polaridad de los compuestos a medida que se incrementa la longitud de la cadena, es decir, que se tornan más hidrofóbicos.

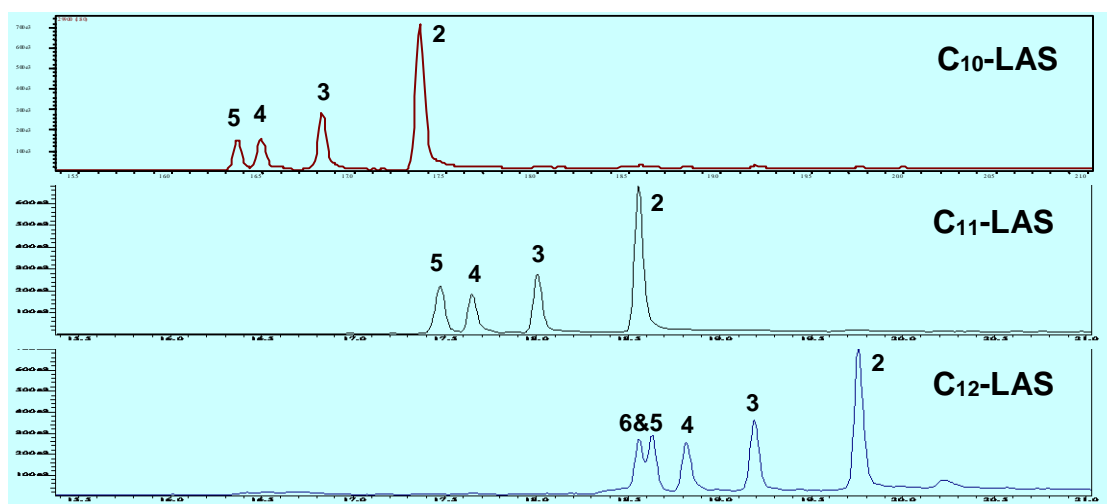


Figura 4.5-Posiciones isoméricas del grupo benceno sulfónico en la mezcla estándar de LAS butilado de 2000 [mg L⁻¹].

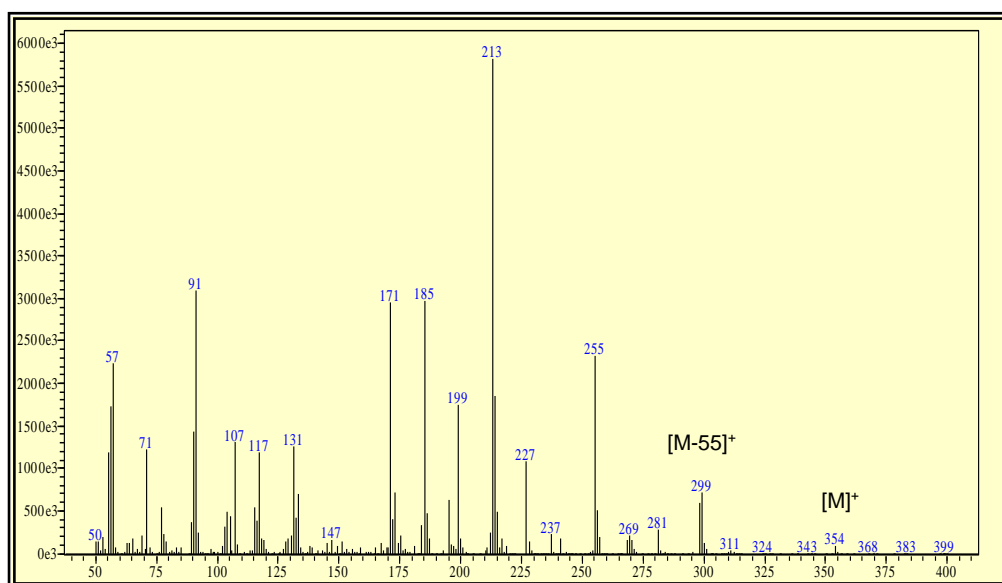


Figura 4.6- Espectro de masas del (4)-C₁₀-LAS, obtenido del estándar de LAS butilado.

Las posibles fragmentaciones que ocurrirían en la cámara de ionización del cromatógrafo de gases pueden ser representados de la siguiente forma en la Figura 4.7

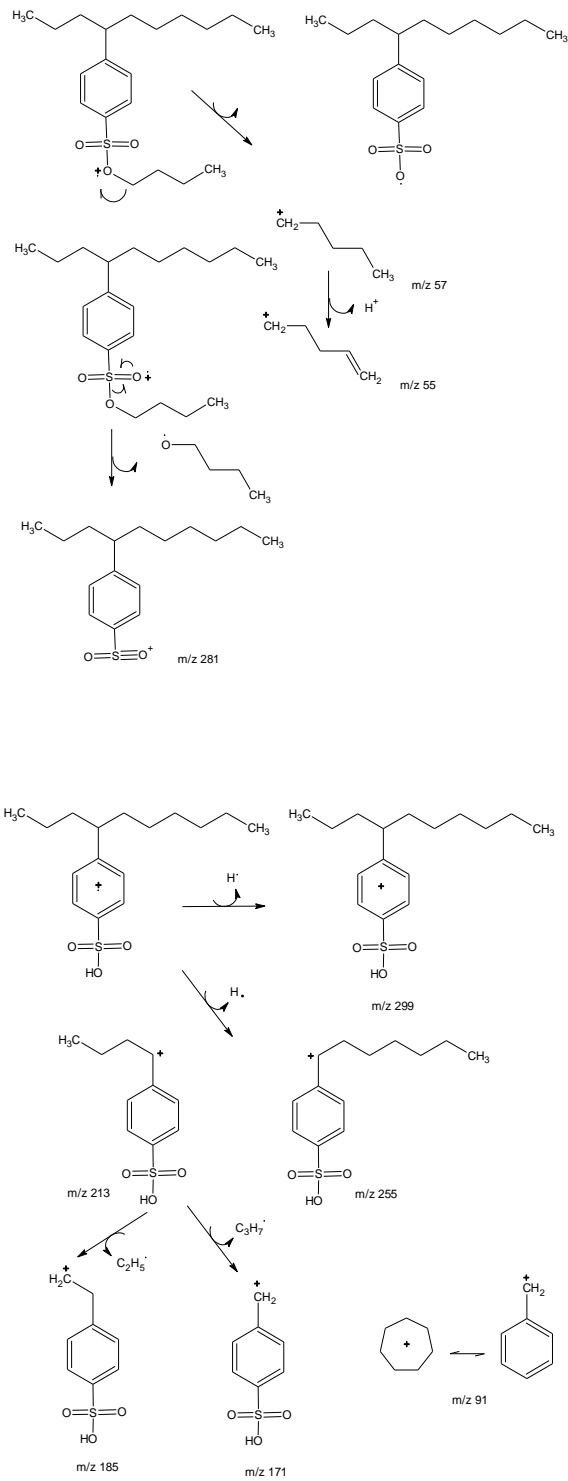


Figura 4.7-Posible fragmentación de (4)-C₁₀-LAS

4.7 Optimización de variables del método de extracción de LAS a través del análisis multivariado

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, tanto de la reacción como de la extracción de muestras de biosólido, que mostraron la presencia de estos compuestos en cantidad importante, se realizó un diseño experimental factorial multivariado, ya que éste es una de las formas más eficientes y precisas, para obtener los valores óptimos de un método analítico (Penteado y col, 2006), ya que detecta y estima cualquier interacción entre factores que no se visualiza al hacer estudios de factores independientes.

Se estudió la respuesta dada como la sumatoria de las áreas de (C₁₀-C₁₂)-LAS, tomando como referencia la mezcla estándar normalizada por el estándar interno C₈-LAS, ya que los picos cromatográficos no se encuentran totalmente resueltos y se solapan mostrando una sola señal al comienzo y al término de cada familia. Los resultados fueron analizados estadísticamente según el software Statgraphics Plus 5.1, a través de un diseño factorial, para encontrar un valor óptimo de respuesta. Se utilizó para el estudio una muestra de biosólido BET2005 y la metodología modificada, ocupando las condiciones cromatográficas optimizadas GC-FID [3.90] obteniéndose la siguiente matriz de respuesta Tabla 4.5.

Tabla 4.5-Matriz de respuesta obtenida para el diseño factorial 3^2 , modelo superficie de respuesta más tres centros, GC-FID.

Experimento	Conc TBA-H [M]	tiempo[min]	Razón áreas
1	0,26	22,5	4,25
2	0,5	5	3,97
3	0,5	22,5	3,66
4	0,5	40	3,44
5	0,02	22,5	3,26
6	0,26	40	4,02
7	0,02	5	2,26
8	0,02	40	3,25
9	0,26	5	3,9
10	0,26	22,5	4,6
11	0,26	22,5	4,4
12	0,26	22,5	4,6
1	0,26	22,5	4,41
2	0,5	5	3,89
3	0,5	22,5	3,69
4	0,5	40	3,53
5	0,02	22,5	3,3
6	0,26	40	4,11
7	0,02	5	2,3
8	0,02	40	3,37
9	0,26	5	4,08
10	0,26	22,5	4,19
11	0,26	22,5	4,19
12	0,26	22,5	4,19

4.7.1 Efectos estimados e interacciones

Tabla 4.6-Análisis de varianza para la razón de áreas

Fuente	"p-value"
A: Concentración de TBA-H	0,0000
B: Tiempo ultrasonido	0,0231
AA:	0,0000
AB:	0,0010
BB:	0,9370

$R^2 = 95,48 \%$

Error absoluto = 0,1139

Error estandar de residuos = 0,1527

La Tabla 4.6 de análisis de varianza (ANOVA), divide la variabilidad en razón de áreas en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos, en este estudio, cuatro de los efectos tienen los "p-value" inferiores a 0,05; los que fueron obtenidos comparando el valor de los cuadrados medios de los efectos y sus interacciones contra un error experimental al cuadrado, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al 95% de nivel de confianza.

El estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica el 95,48% de la variabilidad en razón de áreas, el error absoluto de la media explicaría el promedio del valor de los residuos.

En la Figura 4.8, se observa que el efecto de concentración de TBA-H, es el factor más importante en comparación con el segundo factor estudiado, tiempo de ultrasonido aplicado, siendo ambos efectos positivos. También podemos apreciar un efecto negativo para la combinación de ambos factores.

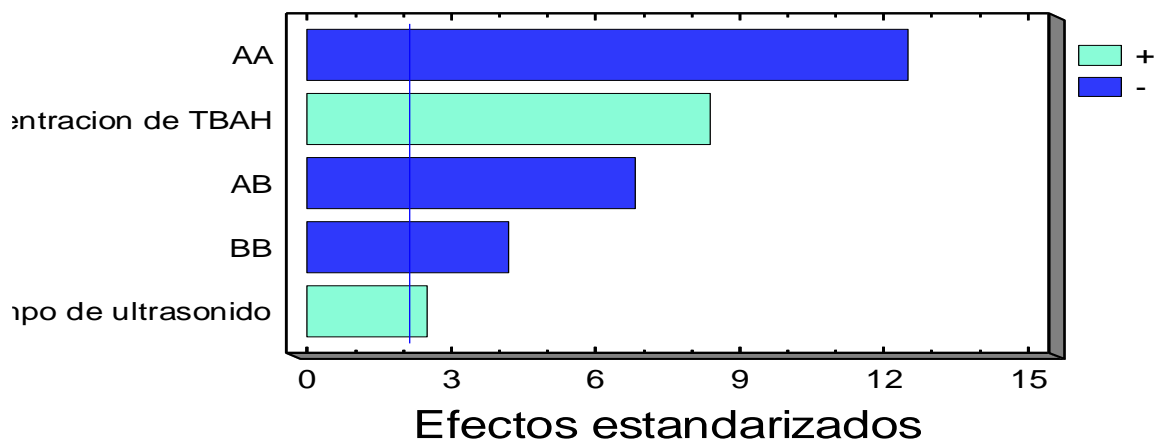


Figura 4.8-Gráfico de Pareto estandarizado para efectos estimados

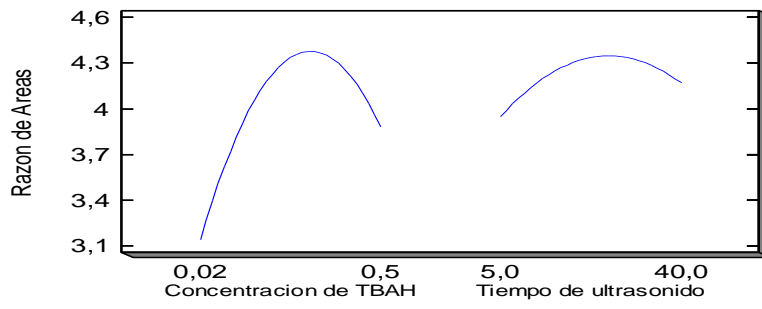


Figura 4.9-Efectos principales

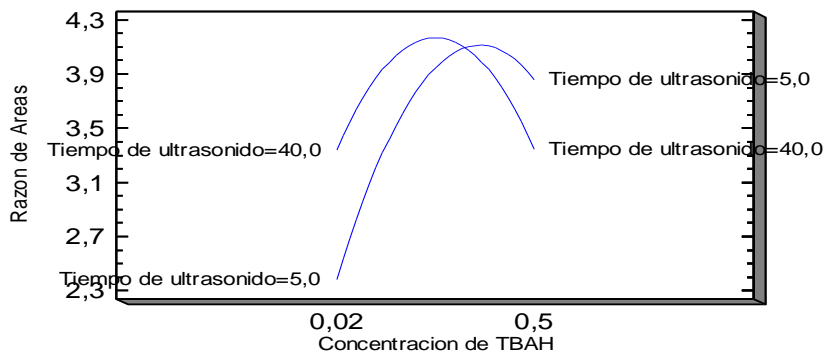


Figura 4.10-Interacción de los efectos

El modelo se ajustó a la siguiente ecuación de regresión.

$$\text{Respuesta} = 1,8534 + 10,9876 A + 0,0699 B - 14,3663 A^2 - 0,0878 AB - 0,0009 B^2$$

Esta ecuación representa un polinomio lineal de 2º orden, que contiene términos asociados y términos cuadráticos. Se consideraron 4 valores centrales para estimar el error experimental. La respuesta está dada por la sumatoria total de las áreas de (C₁₀-C₁₂)-LAS, normalizada por estándar interno. A representa la variable concentración de TBA-H [M] y B el tiempo de ultrasonido aplicado en minutos; los factores A y B se representan mediante una superficie tridimensional en las Figuras 4.11 y 4.12.

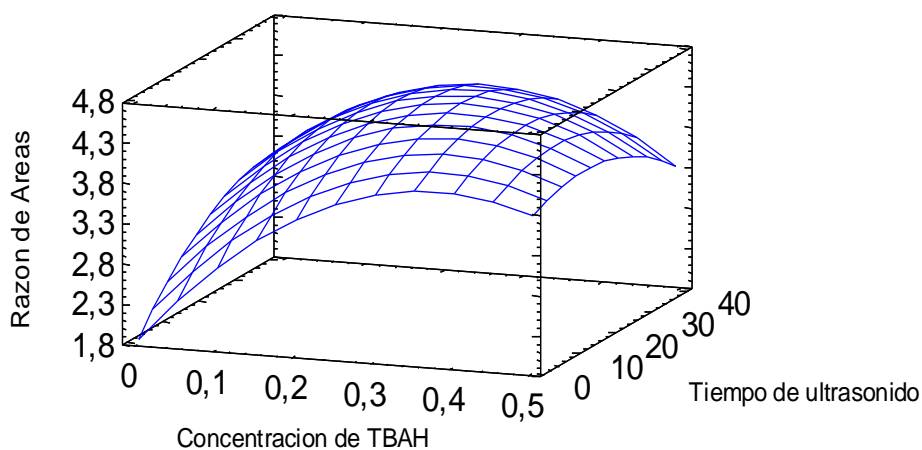


Figura 4.11-Superficie de respuesta estimada para concentración de TBA-H y tiempo de ultrasonido.

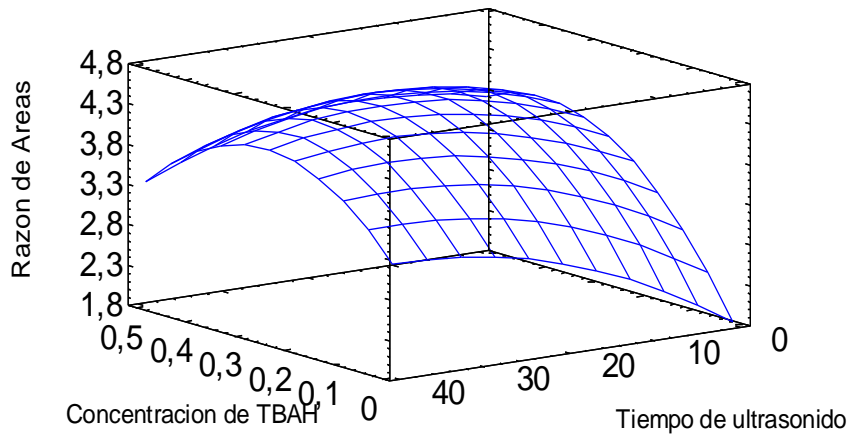


Figura 4.12- Superficie de respuesta estimada para concentración de TBA-H y tiempo de ultrasonido

Como se observa, tanto en la ecuación de regresión, como en las Figuras 4.11 y 4.12, la variable que más afecta la respuesta, y por ende en la extracción y derivatización de LAS en la muestra de biosólido BET2005, es la concentración de TBA-H, presentando un valor óptimo bien definido. El tiempo de ultrasonido no tendría tanta significancia en la extracción, pero si podría aplicarse el proceso en combinación de ambas variables, lo que justifica la realización de este análisis multivariado. Al superar cierto punto el tiempo de ultrasonido, disminuye la respuesta, que podría significar que afectaría la formación del par-iónico, además se puede observar que la zona que presenta los valores máximos de respuesta, se encontraría cercana al centro de la superficie, al igual que el valor óptimo puntual, que muestra el diagrama de nivel (Figura 4.13).

Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada

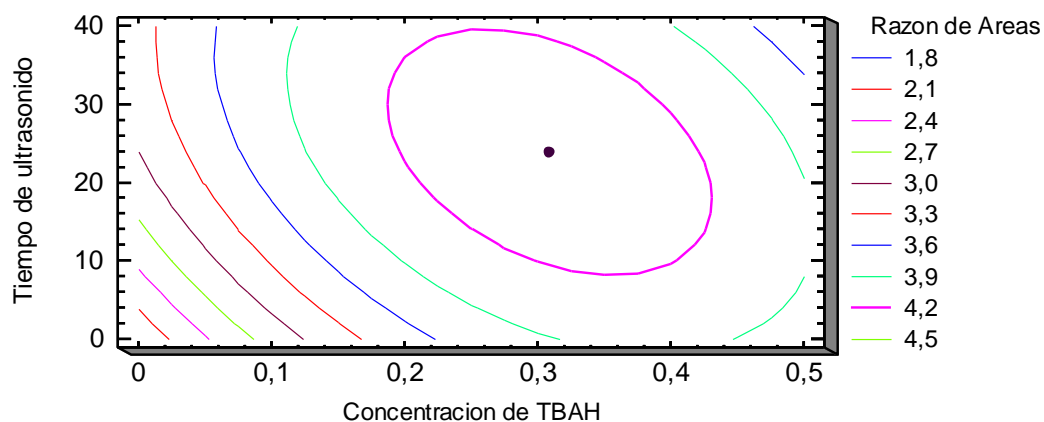


Figura 4.13-Contornos de superficie de respuesta estimada para concentración de TBA-H y tiempo de ultrasonido y el valor óptimo de respuesta [●].

Tabla 4.7- Rangos estudiados y respuestas máxima y combinada de las variables consideradas en el estudio de optimización.

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo natural
A: concentración TBA-H [M]	0,02	0,5	0,30
B: tiempo Ultrasonido [min]	5	40	23
Factor	Inferior	Mayor	Óptimo codificado
A: concentración TBA-H	-1	1	0.21
B: tiempo Ultrasonido	-1	1	0.05
Valor óptimo predicho	Razón de áreas: 4,38		

Como muestra la Tabla 4.7 y la Figura 4.11, las condiciones que permitirían obtener la mejor combinación de factores son: la concentración del agente derivatizante TBA-H 0,30 M y la aplicación de 23 minutos de ultrasonido, lo que se aprecia claramente al observar las superficies de respuesta combinada.

Las condiciones óptimas obtenidas fueron aplicadas a todas las muestras de biosólidos, suelos y mezclas.

4.8 Curvas de calibración

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la extracción de LAS, se realizaron curvas de calibración en las mismas condiciones. Curvas que se utilizaron para la determinación de parámetros analíticos y determinación de la cantidad de LAS presente en las muestras (Tabla 4.8).

Tabla 4.8 Resultados curva de calibración

Concentración LAS-butirado [mg L ⁻¹]	Razón de áreas
250	0,41
500	1,10
750	1,78
1000	2,49
2000	5,63
3000	8,42
4000	11,10

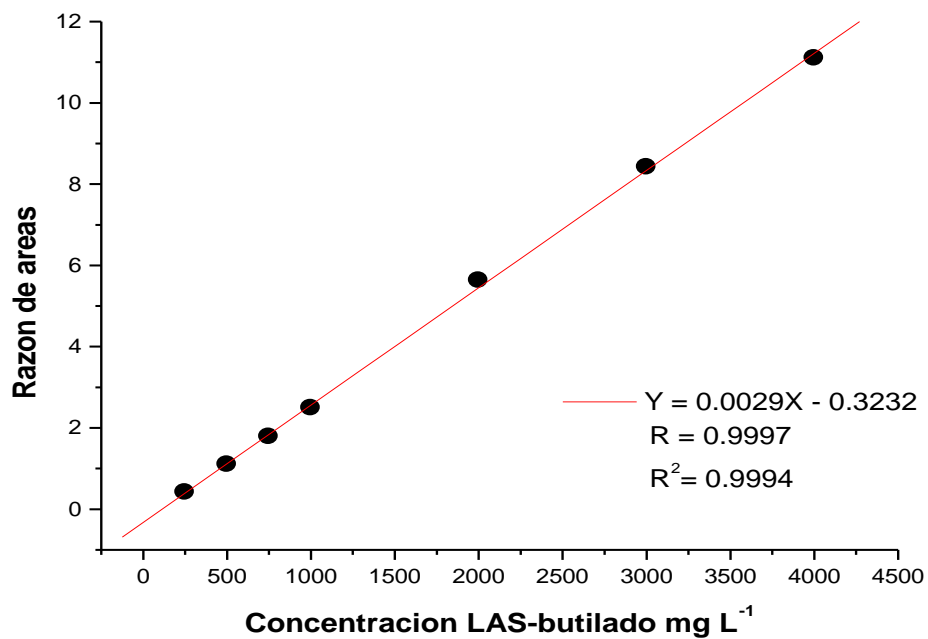


Figura 4.14-Curva de calibración rango 250-4000 [mg L⁻¹]

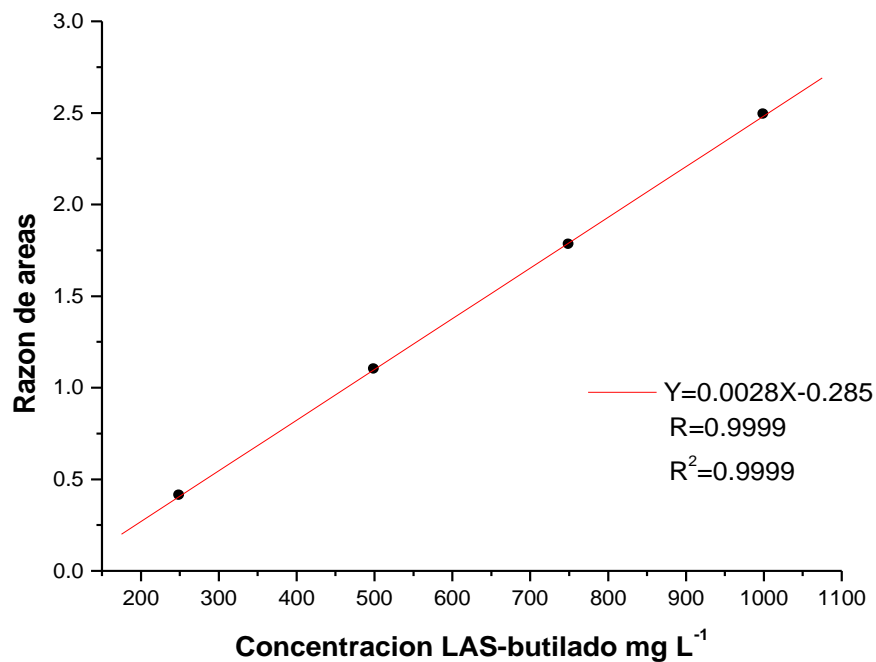


Figura 4.15-Curva de calibración rango 250-1000 [mg L⁻¹]

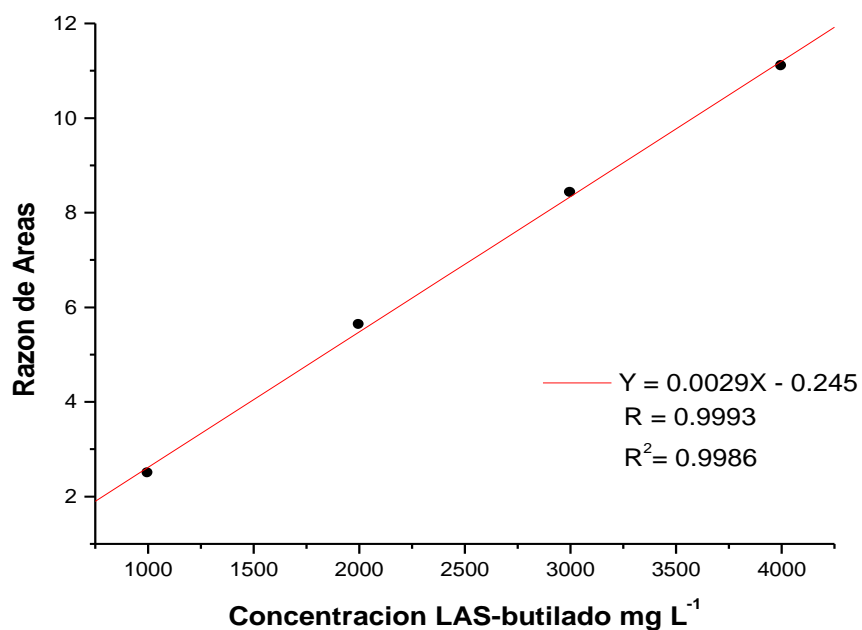


Figura 4.16-Curva de calibración rango 1000-4000 [mg L⁻¹]

Tabla 4.9-Parámetros estadísticos obtenidos

Rango mg L ⁻¹	a	b	S _{y,x}	r	R ² %
250-1000	0,2850	0,0028	0,0095	0,9999	99,99
1000-4000	0,2450	0,0029	0,1670	0.9993	99,86
250-4000	0,3232	0,0029	0,1134	0.9997	99.94

La Tabla 4.9, muestra que el método posee un amplio rango de cuantificación, ya que se encontraron valores similares de las pendientes de las curvas realizadas en distintos rangos. Además podemos observar que el rango entre 250 a 1000 mg L⁻¹, es el que posee un mejor coeficiente de correlación de los datos $r = 0.9999$.

4.9 Validación del método

Se estimaron los parámetros de calidad analítica del método optimizado, como límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) estadísticamente a través de la curva de calibración (Figura 4.14, Tabla 4.8) en un rango de 250-1000 mg L⁻¹; los resultados se muestran en Tabla 4.10.

Tabla 4.10-Límite de detección del método propuesto (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

LAS	LOD	LOQ
(mg L ⁻¹)	10	33
(mg kg ⁻¹)	51	170

Los valores de LOD y LOQ son similares a los obtenidos en la determinación de LAS total por (Ding y col. 1999) utilizando GC(EI)-MS en matrices acuosas. Pero son muy altos en comparación con técnicas actualmente empleadas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), (Priego-Lopez y col., 2004) y electroforesis capilar de zona (CZE), (Ding y col., 2001). En cualquier caso, los límites de detección obtenidos son lo suficientemente bajos como para determinar con seguridad y calidad analítica LAS en biosólidos.

Los resultados para la determinación de la exactitud y precisión del método se muestran en Tabla 4.11

Tabla 4.11-Exactitud y precisión del método optimizado en muestras de biosólidos BET 2004 y BET 2005 enriquecidos con 3 y 7 g kg⁻¹ de LAS.

Matriz Enriquecida con LAS [g kg⁻¹]	Exactitud % Recuperación	Precisión CV (n=5)
BET2004 (3)	92,5	3,69
BET2005 (7)	96,3	4,47

El método de cuantificación presentó porcentajes de recuperación adecuados, cercano al 100 % y una buena repetibilidad para un n=5. Resultados que confirmarían que el método estudiado sería adecuado para la determinación de LAS en la matriz biosólido.

4.10 Determinación de LAS en muestras de biosólidos y suelos

Utilizando la metodología de extracción optimizada, y GC-FID [3.8.8] se determinó la cantidad de LAS total tanto para los biosólidos BET2004 y BET2005, como para los cuatro suelos EM, LP, M y CB. Los tiempos de retención obtenidos fueron comparados con estándares y las áreas fueron normalizadas como razón de la sumatoria de áreas por medio del estándar interno cuyo tiempo de retención fue de 15,4 minutos (Figuras 4.17 y 4.18). La razón de áreas obtenida fue interpolada en la ecuación de regresión mostrada en Tabla 4.8 y Figura 4.14

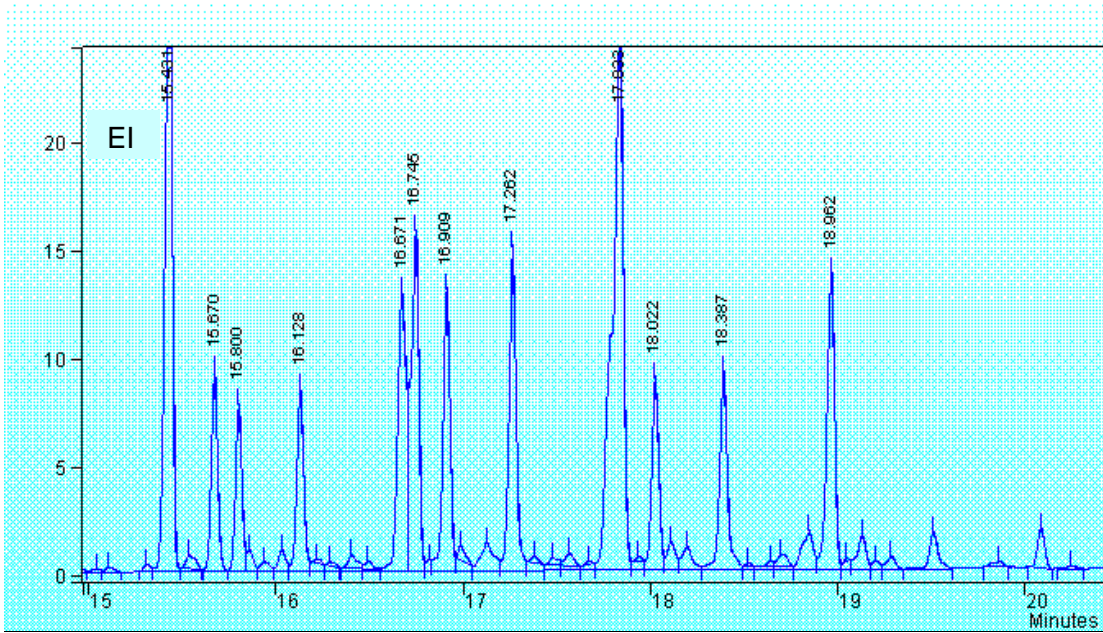


Figura 4.17-Cromatograma del estándar de LAS-butilado 2000 [mg L⁻¹], utilizando metodología y condiciones cromatográficas optimizadas GC-FID.

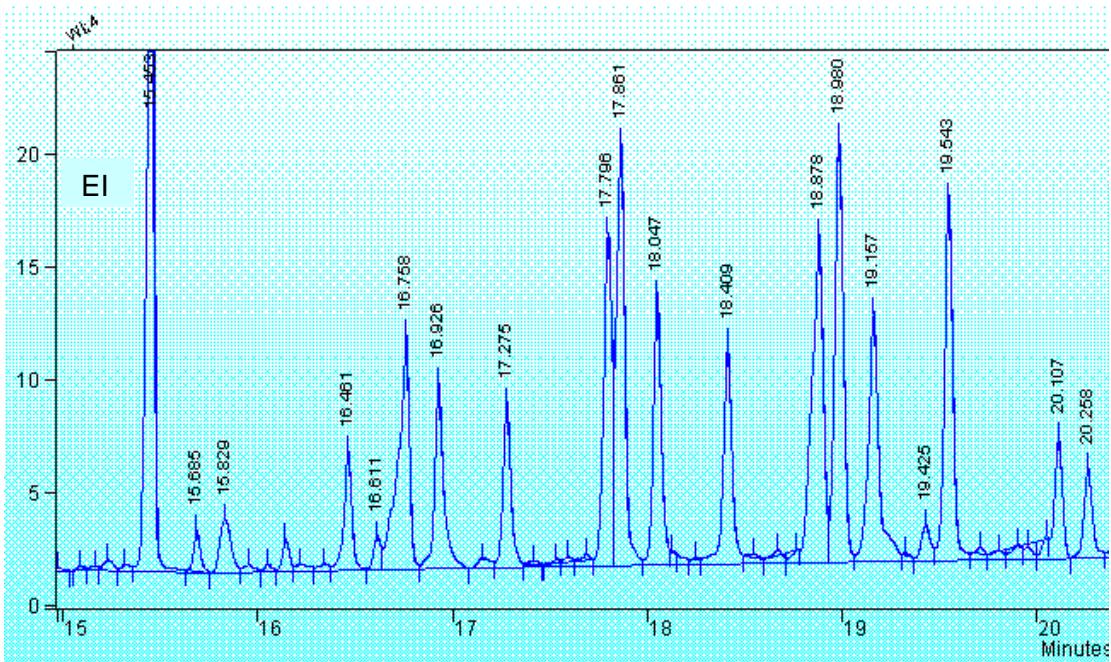


Figura 4.18-Cromatograma extracto orgánico BET2005, utilizando metodología y condiciones cromatográficas optimizadas GC-FID.

Como podemos observar en la Figura 4.18 que corresponde a un extracto del biosólido BET2005, en comparación con el estándar de LAS (Figura 4.17) un alto contenido de compuestos con cadenas con mayor número de átomos de carbono, los cuales serían persistentes al proceso de degradación anaeróbico, utilizado para la estabilización de estos biosólidos y que se adsorberían en la fracción orgánica de éstos a través de interacciones hidrofóbicas (García y col, 2005).

Se confirmó mediante GC(EI)-MS (TIC) para estos extractos, la complejidad de este tipo de matriz (Bruno y col, 2002) y se observó la presencia de compuestos con largos de cadena de 13 unidades de carbono.

Tabla 4.12-Determinación de LAS en biosólido BET2005. (In* = inyección, A** repeticiones muestras)

BET2005	A**1	A**2	A**3	A**4	A**5	PROM	SD	RSD	n
1In* [g kg ⁻¹]	7,88	8,49	8,15	7,23	8,16	7,98	0,47	5,92	5
2in* [g kg ⁻¹]	8,16	7,77	7,78	6,86	8,55	7,82	0,63	8,02	5
Prom [g kg ⁻¹]	8,02	8,13	7,97	7,05	8,36	7,90	0,50	6,36	10

Tabla 4.13-Determinación de LAS en biosólido BET2004. (In* = inyección, S** repeticiones muestras)

BET2004	S**1	S**2	S**3	S**4	S**5	PROM	SD	RSD	n
1In* [g kg ⁻¹]	3,63	4,01	4,05	4,05	4,43	4,03	0,28	7,02	5
2in* [g kg ⁻¹]	3,55	3,96	4,06	4,15	4,38	4,02	0,31	7,59	5
Prom [g kg ⁻¹]	3,59	3,99	4,06	4,10	4,41	4,03	0,29	7,26	10

Las Tablas 4.12 y 4.13 muestran el contenido de LAS determinado en los dos biosólidos, los valores se encontraron en el rango de concentración de 4,03 y 7,90 g kg⁻¹, obteniendo una buena reproducibilidad representada tanto de las repeticiones como de la inyección. Valores similares fueron reportados por (Field y col.1992; García y col. 2005), en este mismo tipo de matriz.

Tabla 4.14-Determinación biosólidos de la Región Metropolitana BET2005 y BET2004

Biosólidos	LAS [g kg ⁻¹]	SD	RSD	n
BET2005	7,9	0,5	6,36	10
BET2004	4,03	0,29	7,26	10

4.11 Contenido de LAS en los suelos y estudio de degradación

Se determinó el contenido de LAS en los cuatro suelos (EM, LP, M, CB), los resultados se muestran en la Tabla 4.16.

Tabla 4.15-Resumen de resultados suelos control EM, LP, M, CB

Suelos Control	LAS [g kg ⁻¹]	SD	RSD	n
EM	0,67	0,04	5,97	4
LP	0,66	0,03	4,55	4
M	0,64	0,02	3,13	4
CB	0,63	0,02	3,23	4

Los cuatro suelos presentaron similares contenidos de LAS (Tabla 4.15), cuyos valores se encontraron entre 0,63 y 0,67 g kg⁻¹. Cabe destacar que se encontró el predominio de compuestos con cadenas largas de 11 y 12 unidades de carbono, lo cual estaría de acuerdo con estudios de adsorción de LAS en sedimentos que informarían que la retención en el suelo de estos compuestos dependería de dos factores: el aumento del largo de la cadena y la posición del grupo, es decir compuestos con isómeros externos serían mayoritariamente retenidos (Hand y col., 1987; Mortensen y col., 2001). Por otra parte la presencia de LAS en estos suelos se podría explicar por el posible riego con aguas residuales o por alguna otra fuente de contaminación no determinada.

4.12 Determinación de LAS en suelos enriquecidos con 0,2 y 1,0 g kg⁻¹ antes de la incubación

Tabla 4.16-Determinación de LAS en suelos enriquecidos con 0,2 y 1,0 [g kg⁻¹]

SUELO + LAS	LAS [g kg ⁻¹]	SD	RSD	LAS esperado [g kg ⁻¹]	% Recuperación
EM-LAS *	1,70	0,02	1,18	1,67	101,8
LP-LAS *	1,54	0,06	3,90	1,66	92,8
M-LAS *	1,64	0,11	6,71	1,64	97,6
CB-LAS*	1,63	0,10	6,13	1,62	100,6
EM-LAS**	0,86	0,06	6,98	0,87	98,9
LP-LAS**	0,78	0,03	3,85	0,86	90,7
M-LAS**	0,75	0,02	2,67	0,84	89,3
CB-LAS**	0,74	0,02	2,70	0,82	90,2

* 1,0 g kg⁻¹ ; ** 0,2 g kg⁻¹

En los suelos enriquecidos con LAS, se encontró alrededor de un 100 % de recuperación del contenido total de LAS que corresponde al nativo y al incorporado (0,2 y 1g kg⁻¹) en estas matrices, lo cual significaría que el método de determinación utilizado también sería apropiado para suelos (Tabla 4.16). Es necesario realizar en un futuro cercano, estudios de adsorción de estos compuestos en este tipo de matrices para estimar posibles mecanismos de retención, en relación a las distintas características de los suelos.

4.13 Determinación de LAS en suelos tratados con biosólido antes de la incubación

Tabla 4.17-Determinación de LAS en suelos tratados con biosólido 30 Mg ha⁻¹, antes de la incubación

Suelo + Biosólido					
30Mg ha ⁻¹	LAS [g kg ⁻¹]	SD	RSD	LAS esperado [g kg ⁻¹]	% Recuperación
EM/BET2005	0,87	0,02	2,30	0,77	113,0
LP/BET2005	0,77	0,05	6,49	0,74	104,0
M/BET2005	0,8	0,06	7,50	0,74	108,1
CB/BET2005	0,72	0,02	2,78	0,71	101,4

Tabla 4.18- Determinación de LAS en suelo enriquecidos 1,0 g kg⁻¹ y tratado con biosólido 30 Mg ha⁻¹, antes de la incubación

Suelo + LAS + biosólido30						
Mg ha ⁻¹	LAS [g kg ⁻¹]	SD	RSD	LAS esperado [g kg ⁻¹]	% Recuperación	
EM/LAS/BET	1,78	0,16	10,76	1,77	100,6	
LP/LAS/BET	1,59	0,02	0,45	1,74	91,4	
M/LAS/BET	1,65	0,02	0,86	1,74	94,8	
CB/LAS/BET	1,61	0,02	5,8	1,71	94,2	

4.14 Determinación de LAS en muestras después del proceso de incubación

Se determinó el contenido de LAS total en las muestras en estudio después de la incubación, Tabla 4.20. Estos resultados fueron tratados estadísticamente a través de la prueba de las diferencias honestamente significativas Tukey (HSD), si el “p-value” es inferior a 0,05 existe diferencia estadísticamente significativas para un nivel de confianza de 95%, la letra igual muestra la no existencia de diferencias, análisis que se realizó en comparación múltiple para las muestras a los 0 días y a los 30 días.

Tabla 4.19- Aplicación del método de las diferencias honestamente significativas Tukey (HSD), para un (n=4).

S	SC	S + B*	S + B*	S + L	S + L	S + L +	S + L +
	[g kg ⁻¹]	0 días	30 días	0 días	30 días	B*	B*
		[g kg ⁻¹]	[g kg ⁻¹]	[g kg ⁻¹]	[g kg ⁻¹]	0 días	30 días
						[g kg ⁻¹]	[g kg ⁻¹]
EM	0,67abcd	0,87e	0,65abc	1,70hi	0,69abcd	1,78i	0,65abc
LP	0,66abc	0,77cde	0,59a	1,54g	1,03f	1,59gh	1,09f
M	0,64abc	0,80de	0,61a	1,64gh	0,67abcd	1,65ghi	0,69abcd
CB	0,63ab	0,72abcd	0,59a	1,63gh	0,76bcde	1,61gh	1,03f

S= suelo; SC=suelo control ; B*= BET2005 dosis 30 Mg ha⁻¹; L= LAS 1 g kg⁻¹

La letra igual muestra la no existencia de diferencias significativas.

4.15 Contenido de LAS en los suelos Control y tratados con LAS y biosólido BET2005

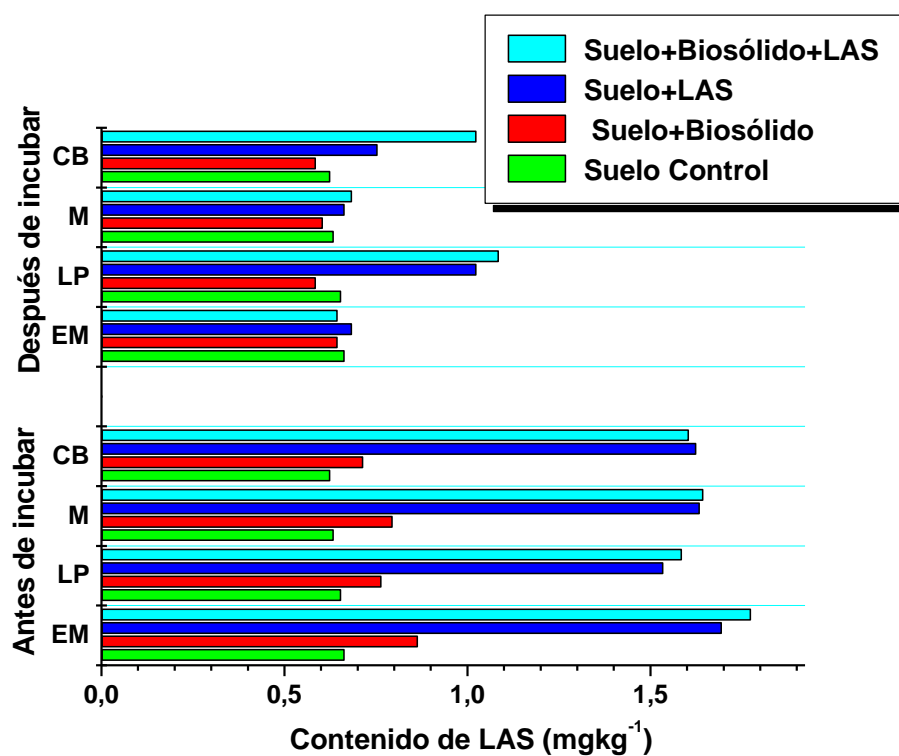


Figura 4.19-Contenido de LAS en los suelos Control, tratados con BET2005 y LAS, antes y después del tratamiento de incubación por 30 días en condiciones controladas de temperatura y capacidad de campo.

Antes del proceso de incubación, los suelos no presentaron diferencias significativas en los contenidos de LAS, cuyo rango de concentración fue de 0,63 a 0,67 g kg⁻¹. Al incorporar el biosólido, BET2005, con un contenido de LAS de 7,9 g kg⁻¹ a los suelos, se encontró que en todos los suelos la concentración de LAS aumentó significativamente entre 14 a 30 %, destacándose más este incremento, en los suelos EM y M con un 30 y 25 % respectivamente (Tabla 4.17). En cambio, en aquellos suelos enriquecidos con LAS, la incorporación del biosólido produjo en general un aumento, pero éste no fue significativo (Tabla 4.18). Después del proceso de incubación, se observó una disminución del contenido de LAS, tanto en las muestras tratadas con biosólido, como en las tratadas con LAS y/o LAS y biosólidos. Se evaluaron estas diferencias estadísticamente a través de la prueba estadística ANOVA complementada con la prueba de Tukey con una probabilidad del 95 % (Tabla 4.19) Esta disminución de la concentración de LAS después del tratamiento de incubación se podría atribuir a un proceso de degradación. En los suelos tratados con el biosólido, la degradación producida fue similar en todos los suelos, alrededor del 20 %. En cambio en los suelos enriquecidos con LAS, la degradación fue alrededor de un 50 %, con excepción del suelo LP que presentó una degradación menor 33 % (Figura 4.20 y Figura 4.21).

Esto último podría deberse a su característica de suelo arenoso, con un menor contenido de materia orgánica, lo que influiría posiblemente en la existencia de una disminuida población microbiana, responsable de la degradación de estos compuestos. En los suelos enriquecidos con LAS y tratados con biosólidos se encontró que los suelos EM y M presentaron una degradación de LAS alrededor del 60 %, en cambio en los otros dos suelos fue sólo del 30 %, lo que podría estar relacionado al mayor contenido de materia orgánica que posee estos suelos.

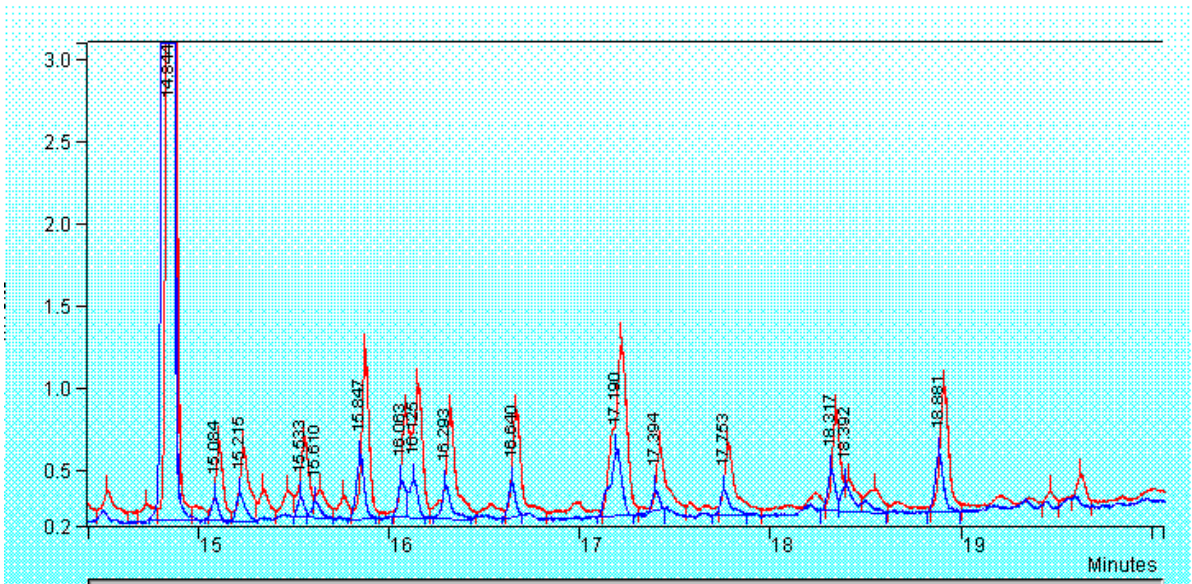


Figura 4.20-Cromatograma del suelo, El Maiten (EM) enriquecido con 1,0 g kg⁻¹ de LAS ;— 0 dias ; — 30 dias.

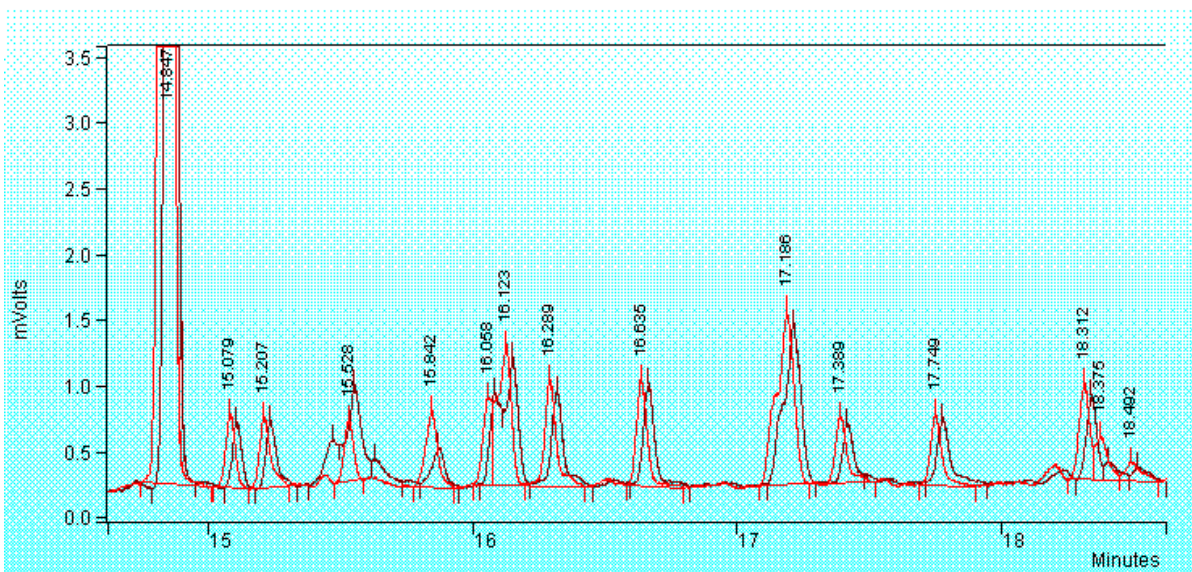


Figura 4.21-Cromatograma del suelo, La Paloma (LP), enriquecido con 1,0 g kg⁻¹ de LAS ;— 0 dias ; — 30 dias.

5 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, fueron obtenidas las siguientes conclusiones:

La metodología propuesta optimizada para la extracción y determinación de LAS en biosólidos a través de formación de pares iónicos, butilación en el inyector y GC-FID, fue más eficiente en tiempo y consumo de solvente que la metodología convencional.

Se identificaron a través de GC-MS, familias de isómeros de LAS desde 10 hasta 12 átomos de carbonos, pudiéndose localizar además las posiciones del grupo benceno sulfónico.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) del método de determinación de LAS en muestras de biosólidos, fueron 51 mg kg^{-1} y 170 mg kg^{-1} respectivamente, los cuales son lo suficientemente bajos para determinar LAS en esta matriz.

La metodología propuesta sería adecuada para la determinación de LAS en biosólido, ya que en muestras enriquecidas con 3 y 7 g kg^{-1} de LAS, se obtuvo una recuperación alrededor del 100 %, con coeficientes de variación entre 3,7 y 4,5 %.

El contenido de LAS en biosólidos de la Región Metropolitana se encontró en el rango de concentración de $4,0$ y $7,9 \text{ g kg}^{-1}$, similares a valores encontrados en otros países.

En los suelos enriquecidos con dos niveles de concentración de LAS ($0,2$ y $1,0 \text{ g kg}^{-1}$) se recuperó alrededor del 100 % del contenido total de LAS, confirmando que esta metodología puede ser aplicada también a suelos.

En los cuatro suelos considerados EM, LP, M y CB se encontraron contenidos de LAS similares, alrededor de $0,6 \text{ g kg}^{-1}$.

La incorporación de biosólido a los suelos aumentó significativamente la concentración de LAS.

El proceso de incubación originó la disminución del contenido de LAS en todas las muestras, que puede ser atribuido a una reacción de degradación.

La degradación de los compuestos de LAS de los suelos tratados con biosólidos fue similar en todas las muestras.

En los suelos enriquecidos con LAS, la degradación de estos compuestos fue menor en el suelo de tipo arenoso y con menor contenido de materia orgánica.

En los suelos enriquecidos con LAS y tratados con biosólidos, la degradación fue mayor en los suelos con alto contenido de materia orgánica.

6 REFERENCIAS

- Aguas Andinas. 2003. Plan de saneamiento de la planta El Trebal y La Farfana. www.aguasandinas.cl
- Bruno F, Curini R, Di Corcia, Forchi I, Nazzari M y Samperi R. 2002. "Determination of Surfactantes and some of their Metabolites in Untreated and Anaerobically Digested Sewage Sludge by Subcritical Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 36:4150-4161.
- CIREN. CORFO. 1984. Centro de información de recursos naturales. Descripción de suelos proyecto Maipo. Santiago, Chile. 102p
- Comisión Nacional del Medio ambiente (CONAMA), 2001. Anteproyecto de reglamento para el manejo de lodos no peligrosos generados en plantas de tratamiento de aguas. Republica de Chile.
- Ding W-H, Lo J-H, Tzing S-H. 1998. "Determination of linear alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by chromatography with ion-trap mass spectrometry". *Journal of chromatography A.* 818:270-279.
- Ding W-H. and Fann J. 2000. "Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sediments using pressuried liquid extraction and ion-pair derivatization gas Chromatography-mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta.* 408:291-297.
- Ding W-H. And Liu C-H., 2001. " Analysis of linear alkylbenzenesulfonates by capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking". *Journal of Chromatography A.* 929:143-150.
- Ding W-H. and Chen C-T. 1999. "Analysis of linear alkylbenzenesulfonates in water samples by large-volume injectio-port derivatization and gas chromatography-mass spectrometry" .*Journal of Chromatography A.* 857:359-364.
- Sparks D., 1995. *Environmental Soil Chemistry.* Press United States of America.
- Epstein E, 2003. "Land application of Sewage Sludge and Biosolid" .CRC press LLC. United States of America. 18-23,87-91p
- Field J., Miller D., Field T., Hawthorne S. and Giger W. 1992. "Quantitative determination of sulfonated aliphatic and aromatic surfactans in sewawe by ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization gas chromatography/mass spectrometry". *Anal. Chem.* 64:3161-3167.

Garcia M.T., Campos E., Ribosa I., Latorre A., Sánchez and Leal J.2005. “Anaerobic digestion of linear alkyl benzene sulfonates: Biodegradation kinetics and metabolite análisis”. Chemosphere. 60:1636-1643.

Gomez C, 2003. “Extracción con solventes asistida por microondas (MASE) del herbicida Atrazina desde suelos chilenos y superficies derivadas modelo. Su determinación por HPLC-DAD”,Memoria de Título, Químico, Universidad de Chile.

Hand V. and Glenwood W., 1987. “Structure-Activity Relationships for Sorption of Linear Alkylbenzenesulfonates”. Environ. Sci. Technol. 21:370-373.

Instituto nacional de Normalización (INN), 2004.Norma Chilena NCh 2880 of2004. Compost-Clasificación y Requisitos. Santiago, Chile.

Jacobsen A.M., Mortensen G. K. and Bruun Hansen H. 2004. “Degradation and Mobility of linear alkylbenzene sulfonate and Nonylphenol in Sludge-Amended Soil”.Environ. Qual.33:232-240.

Jensen, 1999. “Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment”. Sci. Total environ. 226(2-3) :93-111.

Jensen J., Lokke H., Holmstrup M., Krogh PH. And Elsgaard L., 2001. “Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulphonates in agricultural soil. Probabilistic risk assessment of linear alkylbenzene sulphonates in sludge-amended soils”. Environ. Toxicol. Chem. 208 : 1690-1697.

Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Luzón G. And Lechuga M., 2006. “Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening test”.Chemosphere. article in press.

Koga M, Yamamichi Y, Nomoto Y, Irie M, Tanimura T and Yoshinaga T.1999.”Rapid Determination of Anionic surfactants by Improved Spectrophotometric Method Using Methylene Blue” .Analytical Sciences.15:563-568.

Kornecki T, Allred B and Brown G.1997.”Determination of cationic and anionic surfactant concentrations in soil”. Soil Science.162:439-446.

McEvoy J. and Giger W. 1986. "Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sewage sludge by high-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry". *Environ. Sci. Technol.* 20:376-383.

Miller, 2002. "Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Editorial Prentice Hall, España. 111-152p.

Mortensen G.K, Egsgaard H, Ambus P., Jensen S. and Gron C., 2001. "Influence of Plant Growth on Degradation of Linear Alkylbenzene Sulfonate in Sludge-Amended Soil". *J. Environ. Qual.* 30:1266-1270.

Penteado J., Bruns R., Lilian R and de Carvalho F. 2006. "Factorial design optimization of solid phase microextraction conditions for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of linear alkylbenzenes (LABs) in detergents". *Analytica Chimica Acta.* 562:152-157.

Petrovic M. and Barcelo D., 2000. "Determination of Anionic and Nonionic Surfactants, their degradation products, and Endocrine-Disrupting compounds in Sewage sludge by liquid Chromatography/Mass spectrometry". *Anal. Chem.* 72:4560-4567.

Priego-López and Luque de Castro M., 2004. "Superheated water extraction of linear alkylbenzene sulfonates from sediments with on-line preconcentration/derivatization/detection". *Analytica Chimica Acta.* 511:249-254.

Ramis, 2001. "Quimiometría", Editorial Síntesis S.A.. España. 120-128p.

Rodríguez J. 1993. *Manual de fertilización. Colección en agricultura. Facultad de Agronomía. Pontífice Universidad de Chile. Santiago, Chile.* 362p.

Sadzawka A, Carrasco M.A., Grez R., Mora M., 2004. *Métodos de análisis recomendados para suelos Chilenos, Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la ciencia del suelo.*

Sagredo P, 2006. "Influencia de la aplicación de biosólidos en propiedades químicas de suelo de uso agrícola de la Región Metropolitana", *seminario de título Químico Ambiental, Universidad de Chile.*

Sanz E., Prats D., Rodríguez M., Camacho A., 2005. "Effect of temperature and organic nutrients on the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) during the composting of anaerobically digested sludge from a wastewater treatment plant". *Waste Management.* 2005. article in press.

SISS. 2000, Superintendencia de servicios sanitarios, tratamiento de aguas servidas. www.siss.cl.

Trehy M., Gledhill and Orth R., 1990. "Determination of linear alkylbenzenesulfonates and dialkyltetralinsulfonates in water and sedimen by gas Chromatography/Mass Spectrometry". Anal. Chem. 62:2581-2586.

U.S Enviromental Protecction 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. 1999. Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Oficce of Solid Waste.EPA530-R-99-009.

Westall J., Chen H., Zhang W. and Brownawell B., 1999. "Sortion of linear alkylbenzenesulfonates on sediment material". Environ. Sci. Technol. 33:3110-3118.