

UNIVERSIDAD DE CHILE
DOCTORADO EN QUÍMICA



**“DESARROLLO DE MÉTODOS SIMULADORES PARA
DETERMINAR LA FRACCIÓN BIODISPONIBLE DE
TRICLOCARBÁN EN SUELOS TRATADOS CON BIOSÓLIDOS”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química**

Por:

MARCELA VICTORIA VALENZUELA ANDRADE

Directores de Tesis

**INÉS AHUMADA TORRES
PABLO RICHTER DUK**

**SANTIAGO- CHILE
2016**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO

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

MARCELA VICTORIA VALENZUELA ANDRADE

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa pública de Tesis rendida el día.....de de

Directores de Tesis:

Prof. Inés Ahumada Torres. _____

Prof. Pablo Richter Duk. _____

Comisión Informante:

Prof. María Inés Toral (Presidenta). _____

Prof. Waldo Quiroz V. _____

Prof. María Adriana Carrasco R. _____

Prof. Mauricio Isaacs C. _____

Para Macarena (2006-2014)...

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quisiera agradecer a mis directores de Tesis: profesora Inés Ahumada, muchas gracias por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio y apoyarme en el desarrollo de la tesis; y profesor Pablo Richter, por siempre creer en mí y en mis capacidades.

A la Comisión Evaluadora: profesores María Inés Toral, María Adriana Carrasco, Waldo Quiroz y Mauricio Isaacs, por su invaluable aporte al desarrollo de esta tesis.

Agradecer al Soil & Water Sciences Department de University of Florida por su afectuosa recepción, especialmente al profesor George A. O'Connor y su señora Donna y al profesor John Thomas por su ayuda durante la pasantía doctoral.

A mis padres Marcela y Víctor y a mi hermano Rodrigo, por enseñarme que no existen límites cuando uno se lo propone y por apoyarme incondicionalmente en cada una de las decisiones que he tomado. A Yaya y Guey, por ser los pilares que me empujan a ser excelente. A mi familia; mis abuelitos, Amadora y Eleodoro; mis tías y tíos, Verónica, Julia, Marisa, Jaime, Alberto y José; mis primos, Jaime, Natalia, Sebastián, Nicolás, Daniel, José y Macarena, por su apoyo y ayuda durante toda mi vida.

A la familia Fuentealba Castro, gracias por permitirme ser parte de ustedes y compartir sus preciosos momentos.

A mis amigas de la vida, mis queridas Frutas: Karen, Claudia, Daniela, Natalia, Camila, María José, Romina, Consuelo, Isabel y Fernanda, por enseñarme que aunque el tiempo pasa, la amistad perdura.

Agradecer a las profesoras Loreto Ascar y Tatiana Garrido, por su tiempo para largas conversaciones y por sus sabios consejos. A mis compañeros de laboratorio, con los que tuvimos momentos inolvidables entre cumpleaños y titulaciones: Yanina, Valentina, Luis, Lourdes, Natalie, Mercedes y Cristina.

A Montserrat por su amistad y gran espíritu. A Valeria (1990-2016), quien nos dejó muy pronto, muchas gracias por tus sonrisas y sabias palabras.

A los miembros que conforman el CEPEDEQ: Betsabet, Carolina y Andrés, muchas gracias por su apoyo tanto en el ámbito profesional como personal.

Finalmente, agradecer a la persona que elegí para compartir mi vida, Pablo, mi compañero de aventuras, muchas gracias por tu amor, comprensión, paciencia y ayuda durante este desafío.

FINANCIAMIENTO

- Proyecto FONDECYT 1110115 (Prof. Inés Ahumada).
- Proyecto FONDECYT 1140716 (Prof. Pablo Richter).
- NIFA Multi-State FLA-SW-005368 (Prof. George O'Connor).
- Beca Doctoral CONICYT (2012-2015).
- Gastos Operacionales de Tesis Doctoral CONICYT (2013-2014).
- Beca Pasantía Doctoral CONICYT (2014).
- Beca Asistencia a Congresos CONICYT (2012 y 2014).

CONGRESOS

- Determinación de la biodisponibilidad de triclocarbán en suelos tratados con biosólidos.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

Congreso Ciencia Joven 2012. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile, Chile. 6 de septiembre de 2012. Presentación: modalidad póster.

- Determinación de triclocarbán en suelos chilenos tratados con biosólidos.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

V Congreso Iberoamericano de Química Analítica. Montevideo, Uruguay. 7 - 10 de octubre de 2012. Presentación: modalidad póster.

- Determinación de la biodisponibilidad de triclocarbán a través de bioensayos con plantas de trigo, cultivadas en suelo tratado con biosólido.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

XI Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Universidad de Antofagasta, Chile. 12 - 15 de noviembre de 2012. Presentación: modalidad oral.

-Determinación de triclocarbán en aguas a través de microextracción por sorción con disco rotatorio y HPLC-DAD.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza, Argentina. 1 - 4 de octubre de 2013. Presentación: modalidad póster.

- Desarrollo de un método biosimulador con β -ciclodextrina para la determinación de triclocarbán en suelos tratados con biosólido.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

XXX Jornadas Chilenas de Química. Pucón, Chile. 12 - 15 de noviembre de 2013.

Presentación: modalidad oral.

- Determinación de triclocarbán en agua a través de extracción con disco rotatorio y cromatografía líquida de alto rendimiento.

M. Valenzuela, I. Ahumada, L. Ascar, P. Richter.

VII Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental - XII Encuentro de Química Analítica y Ambiental. Viña del Mar, Chile. 6 - 10 de octubre de 2014. Presentación: modalidad oral.

- Estudio comparativo de las configuraciones de un dispositivo rotatorio de extracción para la determinación de triclocarbán en aguas.

M. Valenzuela, M. Figueroa, L. Ascar, I. Ahumada, P. Richter.

32° Congreso Latinoamericano de Química - XXXI Jornadas Chilenas de Química. Concepción, Chile. 19 - 22 de enero de 2016. Presentación: modalidad póster.

PASANTÍA DOCTORAL

Desarrollada en University of Florida, Florida, Estados Unidos, entre marzo y agosto de 2014, a cargo del profesor George O'Connor Ph.D. en el Soil & Water Science Department.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Biosólidos y su utilización	1
1.2.	Contaminantes emergentes	4
1.3.	Triclocarbán y su presencia en matrices ambientales	6
1.4.	Determinación de triclocarbán	10
1.5.	Métodos simuladores	13
1.5.1.	Ciclodextrinas	14
1.5.2.	Extracciones en fase sólida	17
1.6.	Fracción biodisponible y métodos biosimuladores	21
II.	HIPÓTESIS	23
III.	OBJETIVOS	24
3.1.	Objetivo general	24
3.2.	Objetivos específicos	24
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1.	Materiales, reactivos e instrumentación	25
4.1.1.	Estándares	25
4.1.2.	Reactivos	25
4.1.3.	Equipos de extracción utilizados	26
4.1.4.	Software	26
4.1.5.	Semillas	26
4.1.6.	Instrumentación cromatográfica	26
4.1.6.1.	HPLC-DAD	27
4.1.6.2.	LC-MS/MS a	28
4.1.6.3.	LC-MS/MS b	29

4.2.	Suelos y biosólidos	31
4.2.1.	Suelos y biosólido de Chile	31
4.2.2.	Suelo y biosólido de Estados Unidos	31
4.2.3.	Suelo y biosólido de Canadá	32
4.3.	Caracterización física y química de suelos y biosólidos	32
4.3.1.	Determinación de pH	32
4.3.2.	Determinación de carbono orgánico (CO)	33
4.3.3.	Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC)	33
4.3.4.	Determinación de la conductividad eléctrica	33
4.3.5.	Determinación de textura: Método Bouyoucos	34
4.4.	Determinación de la fracción biodisponible de TCC a través de ensayos con plantas de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	34
4.4.1.	Chile	34
4.4.2.	Estados Unidos	36
4.4.3.	Canadá	37
4.5.	Optimización de método de extracción de triclocarbán	38
4.5.1.	Extracción en fase sólida	38
4.5.1.1.	Estudio de reconstitución de la muestra	39
4.5.1.2.	Estudio de elución de la muestra	39
4.6.	Determinación de TCC en suelos, biosólidos, suelos tratados con biosólido y tejido vegetal	40
4.7.	Desarrollo de métodos biosimuladores de triclocarbán en suelos tratados con biosólidos	42
4.7.1.	Optimización del método de extracción de triclocarbán con HP- β -CD	42
4.7.1.1.	Optimización de la extracción líquido-líquido	43
4.7.1.2.	Optimización del tiempo de agitación suelo-HP- β -CD	44

4.7.2.	Optimización de la extracción de triclocarbán con disco rotatorio desde muestras acuosas	44
4.7.2.1.	Variables de extracción	45
4.7.2.2.	Variables de desorción	45
4.7.2.3.	Número de etapas de desorción	46
4.7.2.4.	Estudio de variables generales para RDSE	47
4.7.2.5.	Ensayos de recuperación de TCC	47
4.8.	Aplicación de métodos simuladores a los suelos tratados con biosólido	48
4.8.1.	Método simulador: tratamiento con HP- β -CD	48
4.8.2.	Método simulador: tratamiento con CaCl ₂ 0,001 M y concentración con RDSE (EA/RDSE)	49
4.8.2.1.	Método de rotación horizontal	49
4.8.2.2.	Método de rotación vertical	50
4.9.	Modelamiento de la fracción biodisponible de TCC con las fracciones obtenidas por los métodos simuladores	51
V.	RESULTADOS Y DISCUSION	52
5.1.	Características físicas y químicas de los suelos y biosólidos en estudio	52
5.2.	Optimización del método de extracción de triclocarbán	53
5.2.1.	Extracción en fase sólida de triclocarbán	53
5.2.1.	Etapas de reconstitución de la muestra	54
5.2.2.	Etapas de elución de la muestra	54
5.3.	Determinación del contenido de triclocarbán	55
5.3.1.	Contenido de triclocarbán en suelos y biosólidos	55
5.2.2.	Contenido de triclocarbán en los sistemas suelo-biosólido	56

5.3.	Determinación de la fracción biodisponible de triclocarbán a través de cultivos de plantas de trigo	59
5.3.1.	Biomasa de las plantas de trigo en los distintos sistemas	59
5.3.2.	Determinación de la concentración de triclocarbán en los cultivos de plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido	63
5.3.3.	Factor de translocación de triclocarbán	67
5.4.	Desarrollo de métodos biosimuladores de triclocarbán	70
5.4.1.	Optimización de una metodología con HP- β -CD	70
5.4.1.1.	Estudio del solvente de extracción	70
5.4.1.2.	Estudio del tiempo de equilibrio	71
5.4.2.	Optimización de la extracción con disco rotatorio de triclocarbán desde extractos acuosos.	72
5.4.2.1.	Estudio de variables de la etapa de extracción	72
5.4.2.2.	Estudio de variables de la desorción.	74
5.4.2.3.	Número de etapas de desorción	77
5.4.2.4.	Optimización de variables generales	77
5.4.2.5.	Ensayos de recuperación de TCC	81
5.5.	Aplicación de los métodos simuladores de TCC a los suelos tratados con biosólido	82
5.5.1.	Tratamiento con HP- β -CD	82
5.5.2.	Tratamiento con solución acuosa/RDSE	84
5.5.2.1.	Modo de rotación horizontal (EA/RDSEh)	84
5.5.2.2.	Modo de rotación vertical (EA/RDSEv)	86
5.6.	Factores de concentración de triclocarbán	87
5.6.1.	Factores de bioconcentración (FBC) plantas de trigo	88
5.6.2.	Factores de concentración: métodos simuladores	93

5.7.	Modelamiento de la fracción biodisponible de TCC con las fracciones obtenidas por los métodos biosimuladores	94
5.7.1.	Modelamiento con HP- β -CD	95
5.7.2.	Modelamiento con EA/RDSE	98
VI.	CONCLUSIONES	102
VII.	REFERENCIAS	104
VIII.	ANEXOS	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Propiedades físicas y químicas de triclocarbán	7
Tabla 2	Complejos de inclusión con ciclodextrinas	16
Tabla 3	Variables codificadas para la extracción	45
Tabla 4	Factores evaluados para la desorción	46
Tabla 5	Número de etapas de la desorción	47
Tabla 6	Características físicas y químicas de los suelos	52
Tabla 7	Características físicas y químicas de biosólidos	53
Tabla 8	Estudio de recuperación de TCC de la etapa de reconstitución	54
Tabla 9	Estudio de recuperación en la etapa de elución	55
Tabla 10	Concentración de TCC en suelo y biosólido	56
Tabla 11	Concentración de TCC en suelos tratados con BLA y BCH	57
Tabla 12	Concentración de TCC en suelos tratados con BLA-E	57
Tabla 13	Concentración de TCC en sistema tratado con BGU	58
Tabla 14	Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo TQ	60
Tabla 15	Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo CL	61
Tabla 16	Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo GE	61
Tabla 17	Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo GU	62
Tabla 18	Comparación de factores de translocación de triclocarbán	69
Tabla 19	Recuperación de TCC para el disolvente de extracción de HP- β -CD	71
Tabla 20	Resultado de diseño de experimento de la extracción	73
Tabla 21	Resultado de diseño de experimentos de la desorción	75
Tabla 22:	Ensayos de recuperación de triclocarbán en agua potable.	82
Tabla 23	FBC-R de TCC	89

Tabla 24	FBC-PA de TCC	90
Tabla 25	FBC para triclocarbán en distintos estudios	91
Tabla 26	FC-HP- β -CD de triclocarbán	93
Tabla 27	FC-EA/RDSE de triclocarbán	94
Tabla 28	Resumen estadístico del modelamiento con HP- β -CD	97
Tabla 29	Resumen estadístico del modelamiento con EA/RDSE	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de triclocarbán	6
Figura 2	Esquema de Oasis® HLB	12
Figura 3	Esquema de la forma toroidal de las ciclodextrinas	15
Figura 4	Disposición de los grupos en las ciclodextrinas	15
Figura 5	Estructura del polidimetilsiloxano (PDMS)	18
Figura 6	Conformaciones del disco	20
Figura 7	Modos de rotación del disco, a) modo horizontal y b) modo vertical	21
Figura 8	Cromatograma (a) y espectro de absorción (b) de TCC	27
Figura 9	Espectro de masa de primer orden de TCC	28
Figura 10	Espectro de masa de segundo orden (a) y cromatograma (b) de TCC.	29
Figura 11	Cromatograma (a) y espectro de masa (b) de las transiciones de TCC y $^{13}\text{C}_{13}$ -TCC	30
Figura 12	Cromatogramas correspondientes de TCC y $^{13}\text{C}_{13}$ -TCC	30
Figura 13	Estudios de biodisponibilidad de TCC en Chile	35
Figura 14	Estudio de biodisponibilidad en Estados Unidos	36
Figura 15	Esquema de extracción de TCC desde tejido vegetal	41
Figura 16	Esquema de la limpieza de las muestras	41
Figura 17	Esquema del método simulador: tratamiento con HP- β -CD	49
Figura 18	Esquema del método simulador: EA/RDSE horizontal	50
Figura 19	Esquema del método simulador: EA/RDSE vertical	51
Figura 20	Concentración de TCC en los sistemas de suelo TQ	64
Figura 21	Concentración de TCC en los sistemas de suelo CL	65
Figura 22	Concentración de TCC en los sistemas de suelo GE	65

Figura 23	Concentración de TCC en el sistema GU-BGU	66
Figura 24	FT de TCC de los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH	68
Figura 25	Perfil del tiempo de extracción de TCC con HP- β -CD	71
Figura 26	Carta Pareto estandarizada para la recuperación de la extracción de triclocarbán	74
Figura 27	Carta Pareto estandarizada para la recuperación de la desorción de triclocarbán	76
Figura 28	Superficie de respuesta estimada para la desorción de triclocarbán	76
Figura 29	Efecto de la velocidad de rotación del disco en la extracción de triclocarbán	78
Figura 30	Diagrama de la capa límite de la extracción	78
Figura 31	Efecto pH en la extracción de triclocarbán	79
Figura 32	Diagrama de triclocarbán y pH	80
Figura 33	Efecto del volumen de muestra en el tiempo de extracción de TCC	81
Figura 34	Extracción de TCC con HP- β -CD de los sistemas tratados con BLA	83
Figura 35	Extracción de TCC con HP- β -CD de los sistemas tratados con BLA-E y BCH)	83
Figura 36	Extracción de TCC con HP- β -CD del sistema tratado con BGU	84
Figura 37	Extracción de TCC con EA/RDSE _h del sistema GE-BCH	85
Figura 38	Extracción de TCC con EA/RDSE _h del sistema GU-BGU	85
Figura 39	Extracción de TCC con EA/RDSE _v	87
Figura 40	Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y HP- β -CD) para los sistemas tratados con distintas dosis de biosólido	95
Figura 41	Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y HP- β -CD) para el sistema tratado con la misma dosis de biosólido	96
Figura 42	Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y HP- β -CD) para el sistema tratado con distintas dosis de biosólido	96

Figura 43	Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y EA/RDSE _v) para los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E	98
Figura 44	Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y EA/RDSE _v) para los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E	99
Figura 45	Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y EA/RDSE _h) para los sistemas GE-BCH y GU-BGU	99
Figura 46	Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y EA/RDSE _h) para los sistemas GE-BCH	100

RESUMEN

Los biosólidos son residuos del tratamiento de aguas servidas, que al ser tratados y procesados, pueden ser reciclados y aplicados como co-fertilizantes en suelos. También pueden ser una fuente de contaminación de diversos tipos de compuestos orgánicos.

Triclocarbán (TCC) ha sido utilizado ampliamente desde 1970 como agente antimicrobiano en jabones, enjuagues bucales y pastas dentales. Este compuesto, es apolar, por lo que se une a la materia orgánica de los biosólidos.

La determinación de la fracción biodisponible implica el uso de plantas o animales y un tiempo prolongado de estudio. Por lo tanto, es necesario desarrollar metodologías simuladoras, para obtener una determinación rápida y simple de la biodisponibilidad de TCC en suelos tratados con biosólido. Dos métodos de extracción podrían ser adecuados: el empleo de una solución acuosa de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) y la extracción acuosa con CaCl_2 seguida de una extracción con disco rotatorio en dos disposiciones, horizontal y vertical (EA/RDSE), utilizando como tejido vegetal plantas de trigo.

En los cultivos realizados en sistemas suelo-biosólido, TCC fue detectado en las raíces de las plantas de trigo. En cambio, para los tratamientos con biosólido enriquecido y con biosólido con alta concentración “nativa” de TCC, fue detectado tanto en la raíz como en la parte aérea. Los valores de los factores de translocación son menores a 1, indicando que TCC permanece preferentemente en la raíz de la planta.

Los factores de bioconcentración (FBC) es la razón entre la concentración de TCC en el tejido vegetal y el suelo. Para las raíces y parte aérea, se obtiene que los suelos tratados con biosólido no acumulan TCC, ya que $\text{FBC} < 1$, a excepción de las raíces del suelo tratado con biosólido con una alta concentración “nativa”

de TCC (FBC: 1,7). Los factores de concentración (FC) fueron calculados para los métodos simuladores. Para la extracción con HP- β -CD, los FC < 1, lo que indica que esta metodología no sobreestima la fracción biodisponible, sino que se comporta muy similar a ella. Para la extracción con EA/RDSE, se obtienen FC del orden de 10^{-4} , corroborando una característica de TCC como su baja solubilidad.

Para validar los métodos como biosimuladores, se realiza un modelamiento a través de una correlación simple entre las concentraciones de TCC en el tejido vegetal y las concentraciones determinadas a través de los métodos (HP- β -CD y EA/RDSE, significativas al 95%). Para la ciclodextrina, se obtienen correlaciones significativas y explican entre 37 y 95% de la variabilidad de los datos para las raíces y la parte aérea. Para el modo vertical de EA/RDSE, las correlaciones son significativas y explican entre el 26 y 57% de la variabilidad, para las raíces y la parte aérea, respectivamente. Para el modo horizontal, la correlación es significativa para las raíces, con una explicación del modelo de un 81%.

Se puede concluir que los dos métodos desarrollados, la extracción con HP- β -CD y la EA/RDSE, son biosimuladores de la fracción biodisponible de TCC en las raíces de planta de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólido.

ABSTRACT

Biosolids are a residue of water treatment, which when are treated and/or processed, can be recycled and used as co-fertilizing agents in soils. They are also a pollution focus of organic compounds.

Triclocarban (TCC) has been widely used since 1970, as antimicrobial agent in soaps, mouthwashes and toothpastes. This compound, is non-polar, reason why it binds with organic matter of the biosolids.

The determination of the bioavailable fraction involves the use of plants or animals and prolonged study time. Therefore, it is necessary to develop simulating methodologies for a rapid and simple determination of the bioavailability of TCC in soils amended with biosolids. Two extraction methods may be suitable: the use of an aqueous solution of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) and the aqueous extraction with CaCl_2 followed by an extraction with the rotating disk in two orientations, horizontal and vertical (EA/RDSE), using as vegetal tissue wheat plants.

In crops of wheat plants in soil-biosolid systems, TCC was detected in the roots. On the other hand, in plants grew with spiked biosolids and biosolids with high "native" concentration of TCC, it was detected in roots and shoots. Translocation factor are lower than 1, showing that TCC remains preferentially in the root.

Bioconcentration factors (BCF) is the ratio of the concentration of TCC in plant tissue and soil. For the roots and shoots, is obtained that soils treated with biosolids do not accumulate TCC, cause $\text{FBC} < 1$, with exception of the soil treated with biosolids with a high concentration of "native" TCC ($\text{FBC}: 1,7$). Concentration factor (CF) were calculated for the simulator methods. For the extraction with HP- β -CD, $\text{FC} < 1$ indicating that this methodology does not overestimate the

bioavailable fraction, but behaves very similar to it. For the EA/RDSE method, FC of 10^{-4} are obtained, corroborating TCC characteristic such as low solubility.

To validate the methods as biosimulators, a modeling through a simple correlation between TCC concentration in plant tissue and concentrations determined by simulator methods is used (HP- β -CD and EA/RDSE, 95% significant). For the cyclodextrin, significant correlations are obtained and explain between 37 and 95% of the variability for roots and shoots. For the vertical mode of EA/RDSE, correlations are also significant explaining between the 26 and 57% of the variability for roots and shoots, respectively. For the horizontal mode, correlation is significant to the roots, with a model explanation of 81%.

It can be concluded that, the two developed methodologies (HP- β -CD and EA/RDSE) are biosimulators of the TCC bioavailable fraction in the roots of wheat plants cultured in soils treated with biosolids.

ABREVIATURAS

EPA	Environmental Protection Agency
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PCBs	Polychlorinated biphenyls
PCDD/PCDFs	Polychlorinated dibenzodioxins/ polychlorinated dibenzofurans
VOCs	Volatile organic compounds
CECs	Contaminants of emerging concern
PCCPs	Pharmaceutical and personal care products
TCC	Triclocarbán
FDA	Food and Drug Administration
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
SPE	Solid phase extraction
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
ESI	Electrospray ionization
ASE	Accelerated solvent extraction
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
HP- β -CD	2-hidroxipropil- β .ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
SPME	Solid phase microextraction
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SRE	Silicon rod extraction
PDMS	Polidimetilsiloxano
RDSE	Rotating disk sorptive extarction
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta presión-detector de arreglo de diodos
TQ	Suelo Taqueral
CL	Suelo Calle Larga
BLA	Biosólido Los Andes
BLA-E	Biosólido Los Andes enriquecido
GE	Suelo Genesee
BCH	Biosólido Chicago

GU	Suelo Guelph
BGU	Biosólido Guelph
CO	Carbono orgánico
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
AE	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
A	Acetona
DCM	Diclorometano
H	Hexano
ACN	Acetonitrilo
EA/RDSEh	Extracción acuosa/Disco rotatorio modo horizontal
EA/RDSEv	Extracción acuosa/Disco rotatorio modo vertical
DER	Desviación estándar relativa
Nom	Concentración nominal
Exp	Concentración Experimental
FT	Factor de translocación
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
FBC	Factor de bioconcentración
FC	Factor de concentración
FBC-R	Factor de bioconcentración-raíces
FBC-PA	Factor de bioconcentración-parte aérea

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Biosólidos y su utilización.

Las plantas de tratamiento de aguas servidas tratan grandes volúmenes de aguas servidas, tanto domiciliarias como industriales con el objetivo de producir efluentes de calidad que pueden ser descargados nuevamente al medio ambiente (Walters et al., 2010).

Los biosólidos son subproductos del tratamiento de aguas servidas. Según la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*, EPA), son residuos orgánicos ricos en nutrientes (U.S. EPA, 2007a), que al ser tratados y procesados, pueden tener distintos usos: como un recurso agrícola y forestal, como un residuo que se elimina en rellenos sanitarios y en vertederos; o eliminados por incineración (Ministerio del Medio Ambiente, 2012). Luego de ser procesados, pueden ser reciclados y aplicados como fertilizante para mejorar la fertilidad de los suelos (U.S. EPA, 2007a). Poseen un alto contenido de materia orgánica, por tanto contribuyen a mejorar las propiedades físicas de los suelos, como la porosidad, estabilidad de agregados, retención de agua y aireación (Subsecretaría General de la República, 2009), un alto contenido de macro y micronutrientes (Ministerio del Medio Ambiente, 2012), además ayudan a prevenir la erosión y favorecen el crecimiento de raíces (Epstein, 2003).

Los biosólidos, actúan también como fuente de contaminación de metales pesados y de diversos tipos de compuestos orgánicos, los que pueden contaminar suelos y por tanto, pueden estos contaminantes ser transferidos a productos agrícolas (Subsecretaría General de la República, 2009). Por esta razón, la aplicación de los biosólidos como co-fertilizantes en suelos fue estudiada en conjunto por Aguas Andinas y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Tapia and González, 2005). Entre los años 2001 y 2003, el estudio se centró en el reemplazo total o parcial de los requerimientos nutricionales de nitrógeno y fósforo de algunos cultivos, con lodos provenientes de dos plantas de tratamiento. Los cultivos evaluados fueron tomate, poroto verde, maíz, avena y trigo. Como conclusiones generales, se señalan que el aporte de nitrógeno del lodo no es significativo el primer año de cultivo, pero en la segunda temporada presenta un aporte creciente en los rendimientos. Al tercer año, es posible esperar que el 100% del nitrógeno contenido en los lodos aplicados, se encuentre disponible para los cultivos, igualando así el efecto que producen los fertilizantes minerales como la urea.

En el año 2009, se propuso el “Reglamento para el Manejo de Lodos Generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas” (Subsecretaría General de la República, 2009), donde se fijaron las dosis de aplicación de biosólidos a suelos agrícolas, en 30 Mg ha⁻¹ y en suelos degradados de 90 Mg ha⁻¹ peso seco por año. La regulación considera un período de aplicación de un año; además de información sobre el área de aplicación del biosólido

(superficie, pendiente, profundidad, presencia de napas), caracterización física y química del suelo (pH, conductividad eléctrica, textura, porcentaje de materia orgánica, contenido de metales pesados, etc.); además del manejo agronómico (técnica de incorporación del biosólido al suelo, frecuencia, temporada, dosis de aplicación, tiempo de cosecha y especies a sembrar).

Los componentes de los biosólidos están determinados por la fuente de las aguas servidas y el tipo de tratamiento que reciben (U.S. EPA, 1999). La variedad de componentes pueden ser agrupados en orden de abundancia en compuestos orgánicos, inorgánicos y microorganismos.

Cuando los biosólidos son aplicados al suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser liberados a la atmósfera, retenidos en el suelo, lixiviados a través de la fase líquida del suelo, degradados biológica o químicamente, absorbidos por las plantas ó bioacumulados por los organismos. El riesgo medioambiental que presentan los contaminantes orgánicos que están contenidos en los biosólidos dependen de los siguientes factores: i) su concentración, ii) su persistencia, iii) su habilidad para incorporarse en la cadena trófica, iv) su labilidad y v) su biotoxicidad (Epstein, 2003).

Los compuestos orgánicos que presentan características tóxicas y que se encuentran en los biosólidos son muy diversos. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDFs), compuestos orgánicos

volátiles (VOCs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles clorados y no clorados y contaminantes emergentes (Bright and Healey, 2003; McClellan and Halden, 2010).

1.2. Contaminantes emergentes.

Los contaminantes de interés emergente (*contaminants of emerging concern*, CECs) son denominados así, por el riesgo que presentan para la salud humana y para el medio ambiente asociado a su presencia, por la frecuencia de aparición o que la fuente puede no ser conocida (U.S. EPA, 2014a). Estos contaminantes, en general, no han sido normados en ninguna parte del mundo. Entre ellos, se encuentran los retardantes de llamas, los compuestos perfluorinados, los surfactantes, los aditivos industriales y de la gasolina, los nanomateriales y productos farmacéuticos y de cuidado personal (Clarke and Smith, 2011; Díaz-Cruz et al., 2009; U.S. EPA, 2014b).

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (*pharmaceutical and personal care products*, PPCPs) son cualquier producto usado por los individuos para la salud personal, razones cosméticas o por la agroindustria para mejorar el crecimiento o la salud del ganado (U.S. EPA, 2012a). Comprenden miles de compuestos químicos, incluyendo fármacos tanto de venta libre como de prescripción, drogas veterinarias, fragancias, lociones y cosméticos. Las principales fuentes de estos contaminantes son la actividad humana, los fármacos ilícitos, los fármacos de uso veterinario (antibióticos y esteroides,

principalmente), la agroindustria y residuos de la industria agrícola, farmacéutica y hospitalaria. Son productos diseñados para su uso externo en el cuerpo humano y no son objeto de alteraciones metabólicas, por lo tanto, altas cantidades de ellos ingresan al medioambiente inalterados luego de su uso regular (Ternes et al., 2004). En años recientes han surgido como microcontaminantes en aguas (subterráneas, superficiales y de desagüe), en suelos, en biosólidos y en suelos tratados con biosólidos (Brausch and Rand, 2011; Clarke and Smith, 2011; Sabourin et al., 2009; Walters et al., 2010).

La remoción de los PPCPs durante el tratamiento de aguas residuales generalmente no es completa, creando de este modo un camino para la entrada de éstos compuestos al ambiente acuático, a través de la recuperación de las aguas residuales, o en ambientes terrestres, por la aplicación de los biosólidos a los suelos (McClellan and Halden, 2010).

Durante las diferentes etapas del tratamiento de las aguas residuales, los PPCPs, sus metabolitos y sus conjugados, pueden ser: i) completamente transformados o mineralizados, ii) ser persistentes, lo que implica que una cierta cantidad; en función de su lipofilicidad u otras posibilidades de unión como la formación de enlaces, serán retenidos en los lodos o biosólidos o iii) persistentes y polares, por lo que serán liberados con el efluente a ambientes acuáticos (Walters et al., 2010).

Entre los productos de cuidado personal, se encuentran los compuestos que se utilizan en lociones, en las pastas dentales, en jabones, en repelentes de insectos y protectores solares como lo son los antimicrobianos, preservantes, fijadores y fragancias (Brausch and Rand, 2011; U.S. EPA, 2012b).

1.3. Triclocarbán y su presencia en matrices ambientales.

Uno de los agentes antimicrobianos que pertenecen a los PPCPs es el triclocarbán (TCC; 3,4,4'-triclorocarbanilida, Figura 1), que es usado ampliamente en champú, jabón, desodorante y pasta dental (Clarke and Smith, 2011). La producción e importación anual de TCC en Estados Unidos está entre 250 y 500 toneladas métricas (U.S. EPA, 2002). Luego de ser utilizado, el TCC ingresa al medio ambiente, a través de la descarga de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas servidas y por la aplicación de biosólidos en el suelo (Halden and Paull, 2005).

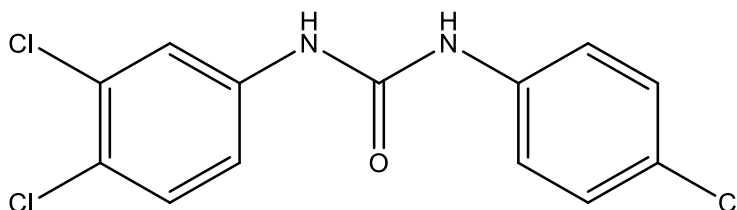


Figura 1: Estructura de triclocarbán.

Triclocarbán, presenta un coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) experimental de 3,5 y calculado de 4,9 (Snyder et al., 2010a). Cerca de un 75% del TCC que se encuentra en los afluentes de plantas de tratamiento de aguas

residuales es “secuestrado” en los lodos y por lo tanto, es retenido en los biosólidos (Al-Rajab et al., 2009). Según los datos de la Tabla 1, TCC es un ácido extremadamente débil, no es volátil y poco soluble en agua.

Tabla 1: Propiedades físicas y químicas de triclocarbán (Ternes et al., 2004).

Propiedad	Valor
Masa molar	315,6 g mol ⁻¹
Punto de fusión	250°C
Punto de ebullición	> 300°C
Densidad	0,65 g cm ⁻³
Presión de vapor (50°C)	< 1 hPa
Log K_{ow} *	3,5-4,9
pK _a **	12,7
Solubilidad en H ₂ O*	0,045 mg L ⁻¹

*: (Snyder et al., 2010a), **: (Chu and Metcalfe, 2007).

En una investigación realizada en Estados Unidos, donde se analizaron muestras de afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, se detectó TCC en concentraciones medias de $6,7 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ y $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Halden and Paull, 2005). En un estudio de campo, que fue desarrollado en suelos tratados con biosólidos en Estados Unidos, se determinó que la escorrentía de TCC corresponde sólo a un 0,001% (Sabourin et al., 2009).

En un estudio donde 23 muestras de biosólidos con distintos tratamientos de estabilización: compost, estabilización con cal, digestión anaeróbica y uno no tratado, TCC fue detectado en una concentración media de $19 \pm 11 \text{mg kg}^{-1}$

(Snyder et al., 2010a). En otra investigación desarrollada en el año 2001, donde se recolectaron muestras de biosólidos de 94 plantas de tratamiento de aguas servidas, en el que se analizaron 110 muestras, se encontró TCC en el 100% de las muestras, siendo también, el analito más abundante con una concentración media de $36 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$ (McClellan and Halden, 2010).

En la investigación titulada “*Targeted National Sewage Sludge Survey*” realizado por la EPA entre los años 2006 y 2007, se analizaron 84 muestras de biosólidos y consideraba 145 analitos; TCC fue detectado nuevamente en un 100% de las muestras y con concentraciones de 187 y $441000 \mu\text{g kg}^{-1}$, como mínimo y máximo, respectivamente (U.S. EPA, 2009).

El triclocarbán no se degrada bajo condiciones anaeróbicas y tiene una vida media calculada de 108 días en un suelo donde fue degradado en ambiente aeróbico (Ying and Kookana, 2007). En otro estudio, se estimó su vida media en un rango de 87 a 231 días, lo que depende del tipo de suelo, las características físicas y químicas de éste y si el suelo ha sido tratado con biosólido (Wu et al., 2009). Triclocarbán persiste cuando es aplicado a los suelos como componente de los biosólidos, donde sólo un 2 a 4% es mineralizado en un período de 7,5 meses. Ningún metabolito de TCC fue detectado. Esto indica que el TCC presente en los biosólidos se vuelve menos biodisponible en el tiempo, por lo tanto, se esperan menores absorciones por la biota y lixiviaciones a través del perfil del suelo (Snyder et al., 2010b).

En un estudio donde se consideran las concentraciones ambientales y toxicidad de distintos tipos de productos de cuidado personal en el ambiente acuático, el TCC es tóxico para invertebrados acuáticos y peces a corto y largo plazo (Brausch and Rand, 2011). Además, en una investigación desarrollada sobre contaminantes emergentes en biosólidos y su aplicación posterior a suelos agrícolas, al TCC se le asigna el puntaje máximo en aspectos como bioacumulación ecológica y ecotoxicidad en suelo (Clarke and Smith, 2011).

El triclocarbán, es conocido por interferir con la reproducción de los mamíferos y puede producir un trastorno en la sangre llamado metahemoglobinemia. Es asociado también, a la amplificación de la actividad de las hormonas sexuales esteroideas en los receptores humanos de estrógeno y andrógenos (Venkatesan et al., 2012). Al agregar TCC a la dieta de ratas por seis meses en concentraciones de 3000 y 10000 mg kg⁻¹ diarios, se produjo una degeneración en los tubos seminíferos y oligospermia (“Triclocarban [CASRN 101-20-2] Potential Designated Chemical,” 2010; Wright et al., 1975).

La absorción de TCC ha sido estudiada en plantas de poroto de soya donde el suelo fue tratado con biosólidos que fueron enriquecidos con 10 mg kg⁻¹. Luego de 110 días, se detectó TCC en las raíces, tallo, hojas y poroto de las plantas en concentraciones que varían desde 2,6 ± 0,3 µg kg⁻¹ en el poroto a 168 ± 34 µg kg⁻¹ en la raíz (Wu et al., 2010). En un estudio de campo realizado en Canadá donde se aplicó biosólido al suelo en una tasa de 8 Mg ha⁻¹, el TCC

no fue detectado en tomate, zanahorias, papas y maíz dulce (Sabourin et al., 2012). En cambio, en un estudio realizado utilizando macetas, sí fue detectado en las raíces, tallos y frutos de las plantas cultivadas de pimentón, repollo, lechuga, rábano y tomate, en concentraciones que varían desde $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el tallo de la planta de repollo a $600 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la raíz de la planta de tomate. La concentración promedio de TCC en el suelo fue de $900 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Wu et al., 2012).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), ha publicado en septiembre de 2016, un listado de 19 compuestos antibacterianos, que tienen prohibido su uso en jabones (a partir de septiembre de 2017), ya que no se ha comprobado su seguridad y eficacia en su uso diario por un tiempo prolongado (U.S. FDA, 2016a). Entre estos compuestos, se encuentra triclocarbán, cuya presencia puede provocar resistencia bacteriana y efectos hormonales no deseados, ya que puede actuar como disruptor endocrino (U.S. FDA, 2016b).

1.4. Determinación de triclocarbán.

La determinación de TCC ha sido realizada a través de cromatografía líquida (LC), ya que no es volátil y no presenta grupos derivatizables (Figura 1). En estudios de biodisponibilidad (niveles traza), se necesita una herramienta analítica que posea una alta sensibilidad y que permita confirmar inequívocamente la identidad del compuesto estudiado. Con este propósito, la

cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), ha sido ampliamente utilizada en la determinación de TCC en distintas matrices ambientales como aguas servidas, suelos, biosólidos, suelos tratados con biosólido y tejidos vegetales y animales (Halden and Paull, 2004).

En el año 2007, la EPA desarrolló una metodología estándar (método 1694), para la determinación de productos farmacéuticos y de cuidado personal en agua, suelos, sedimentos y biosólidos por LC-MS. En el proceso de preparación de muestra, se realiza una extracción con acetonitrilo y ultrasonido, seguida de una extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), para la limpieza de la muestra (*clean-up*), lo que permite que la determinación posterior sea realizada con la menor cantidad de interferencias presentes originalmente en el extracto de la muestra (U.S. EPA, 2007b).

La fase sorbente comúnmente utilizada en la etapa de SPE para la determinación de TCC es la fase HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*, HLB) (Waters Inc., 2011). Esta fase es un copolímero macroporoso que presenta cantidades balanceadas de monómeros hidrofílico (N-vinilpirrolidona) y lipofílico (divinilbenceno). Este balance hidrofílico-lipofílico proporciona tanto interacciones polares como no polares (Figura 2). Es comercializada generalmente en cartuchos de distintas masas, volúmenes y tamaños de partícula (Waters Inc., 2015).

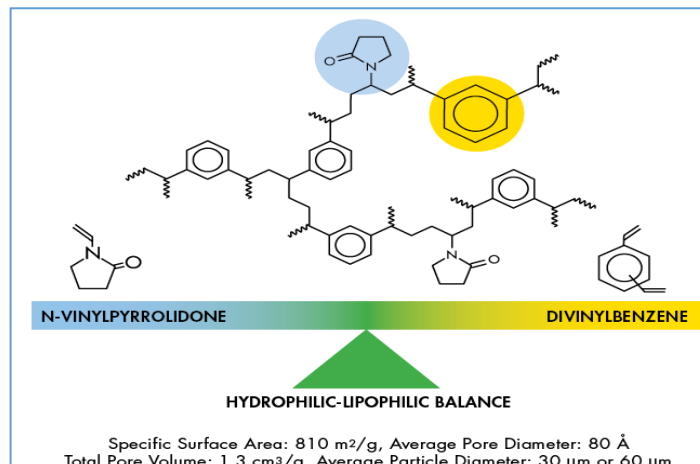


Figura 2: Esquema de Oasis® HLB (Waters Inc., 2015).

Los primeros estudios que implicaron el uso de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (Halden and Paull, 2004), detectaron una señal distintiva sólo en el modo negativo de la ionización por *electrospray* (ESI). Los iones utilizados para la determinación de TCC son 313 m/z y 315 m/z, dependiendo del tipo y la sensibilidad del espectrómetro de masas en que se trabaja (Chu and Metcalfe, 2007; Snyder et al., 2010a).

El triclocarbán marcado isotópicamente con deuterio (TCC-d₇) (Halden and Paull, 2004; Snyder et al., 2011, 2010a) y carbono-13 (TCC-¹³C₁₃, TCC-¹³C₆) (Cha and Cupples, 2010; Chu and Metcalfe, 2007), han sido ampliamente utilizados como estándar interno, también denominado subrogante, para eliminar el efecto que pueden producir las diferentes matrices ambientales.

1.5. Métodos simuladores.

La concentración total de los contaminantes en el medio ambiente, no puede ser relacionada de manera directa con su biodisponibilidad (Lanno et al., 2004). La fracción biodisponible depende de la especie química, así como del tipo de matriz ambiental, las características físicas y químicas que ésta presenta y del sistema biológico en estudio. El riesgo que se produce por la exposición de suelos a contaminantes orgánicos que son incorporados por la aplicación de biosólidos, depende de la probabilidad de que los contaminantes sean liberados de la matriz e integrados a la cadena trófica.

Las técnicas para determinar la fracción biodisponible en el suelo, usualmente implican el uso de plantas o animales (Smith and Hill, 2006; Tao et al., 2004). Por lo que, es necesario desarrollar métodos predictivos para obtener una determinación rápida y simple, de la biodisponibilidad de los contaminantes.

Se ha propuesto la medición química indirecta de la biodisponibilidad, como el uso de extractantes suaves o no exhaustivos, para imitar la liberación y la exposición de sistemas vivos a contaminantes orgánicos no polares (Lanno et al., 2004). En un estudio, se utilizó la extracción acelerada con solvente (*accelerated solvent extraction*, ASE), realizando extracciones secuenciales con agua, *n*-hexano y mezcla *n*-hexano/acetona de un suelo contaminado con DDT y sus metabolitos (Σ DDT). Como indicador de la biodisponibilidad (bio-indicador) se utilizaron raíces de plantas de trigo. La fracción de Σ DDT que se extrae del suelo

con *n*-hexano fue la adecuada para estimar la biodisponibilidad en plantas de trigo (Tao et al., 2004).

1.5.1. Ciclodextrinas.

Los extractantes no exhaustivos, como las ciclodextrinas, han sido utilizadas para la extracción de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados (*polychlorinated biphenyls*, PCBs) en suelos con el fin de estimar la biodisponibilidad de contaminantes de baja polaridad. La hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) fue el extractante apropiado para distinguir entre los residuos libres y los fuertemente unidos a la matriz suelo, e inferir así la fracción biodisponible de estos contaminantes (Wong and Bidleman, 2010). Otro estudio realizado en sedimentos que se encuentran contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) donde se estudia la extracción no exhaustiva utilizando soluciones de Triton X-100 e HP- β -CD, demostró que este último es el que se relaciona mejor con la biodisponibilidad de estos compuestos (Cuypers et al., 2002).

Las ciclodextrinas (CDs) están formadas por varias moléculas de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) unidas por un enlace α -1,4 y poseen una forma toroidal (Figura 3) (Contreras, 2001). Se denominan según el número de moléculas de glucosa que las componen, 6 es α -ciclodextrina, 7 es β -ciclodextrina y 8 es γ -ciclodextrina.

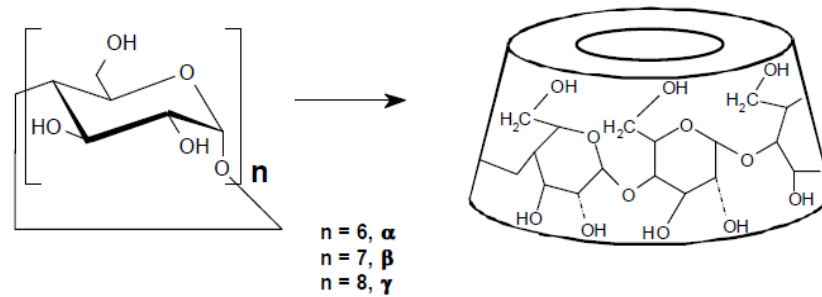


Figura 3: Esquema de la forma toroidal de las ciclodextrinas (Contreras, 2001).

Las ciclodextrinas poseen una distribución que se denominan sitios (Figura 4). En el sitio hidrofílico, los hidroxilos primarios se encuentran en el borde más pequeño, mientras que los secundarios, en el borde más grande. Esto produce que las ciclodextrinas sean solubles en agua. En el sitio hidrofóbico, se encuentran los hidrógenos de los grupos $-CH$ y $-CH_2$, además de los puentes glucosídicos de oxígeno. Por lo tanto, la formación de la cavidad, proporciona una matriz hidrofóbica en solución acuosa (Contreras, 2001; Del Valle, 2004).

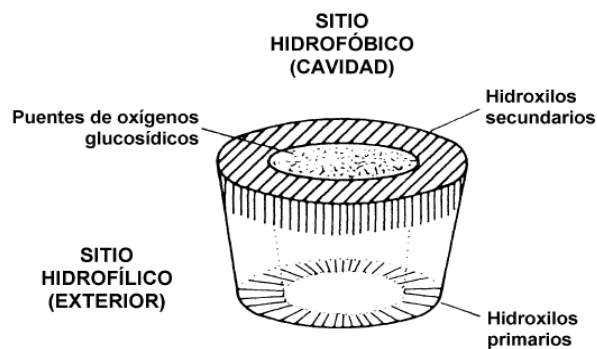


Figura 4: Disposición de los grupos en las ciclodextrinas (Contreras, 2001).

Las ciclodextrinas pueden reducir el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) de varios compuestos. Al poseer una cavidad apolar, las moléculas hidrofóbicas

se pueden unir a ésta, formando complejos de inclusión (Tabla 2) (Contreras, 2001).

Tabla 2: Complejos de inclusión con ciclodextrinas (Del Valle, 2004).

CDs	Formación de complejos de inclusión
α -CD	Moléculas de bajo peso molecular y cadenas alifáticas
β -CD	Moléculas aromáticas y heterociclos
γ -CD	Macrociclos y esteroides

Las ciclodextrinas en solución acuosa, se encuentran rodeadas de moléculas de agua, las cuales no pueden satisfacer los puentes de hidrógeno potenciales, por lo tanto, presentan una alta entalpía. La energía del sistema disminuye cuando las moléculas de agua son reemplazadas con moléculas huésped, que son menos polares, formando así un compuesto de inclusión (Del Valle, 2004). Cuatro interacciones que son favorables energéticamente, desplazan el equilibrio hacia la formación del complejo de inclusión (Del Valle, 2004).

1. El desplazamiento de moléculas de agua polares desde la cavidad apolar de la ciclodextrina.
2. El aumento del número de los puentes de hidrógeno formados cuando el agua desplazada vuelve al medio.
3. Una reducción entre las interacciones repulsivas entre la molécula huésped y el ambiente acuoso.

4. Un incremento en las interacciones hidrofóbicas cuando el huésped se inserta dentro de la cavidad apolar de la ciclodextrina. Una vez dentro de la cavidad, la molécula huésped realiza ajustes conformacionales, para obtener un máximo de las débiles fuerzas de Van der Waals.

Las moléculas de agua no pueden satisfacer los puentes de hidrógeno potenciales, ya que se encuentran dentro de la ciclodextrina, por lo tanto, presentan una alta entalpía. La energía del sistema disminuye cuando las moléculas de agua son reemplazadas por moléculas huésped, ya que son menos polares (Del Valle, 2004).

Las interacciones principales que forman parte de la formación del complejo de inclusión son: fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, liberación de tensión del anillo en la ciclodextrina y cambios en la tensión solvente-superficie (Del Valle, 2004).

La β -ciclodextrina presenta una baja solubilidad en agua (1,85% p/v), por lo que al esterificar el grupo hidroxilo secundario para formar la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), se aumenta la solubilidad en agua a 7,3% p/v (Del Valle, 2004; Duan et al., 2005).

1.5.2. Extracciones en fase sólida.

Las extracciones en fase sólida, como la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME) ha sido utilizada para estimar la biodisponibilidad

de diversos compuestos orgánicos, como naftaleno (Liu et al., 2010) y xenoestrógenos (Engler and Lemley, 2013), ambos en suelos y DDT y sus metabolitos en sedimentos marinos (Bao et al., 2013).

Se han utilizado extracciones acuosas con soluciones de cloruro de calcio (CaCl_2) según la norma ISO/TS 21268-1:2007, para su posterior uso en el análisis químico (ISO, 2008). Se ha aplicado esta norma en la determinación de la fracción biodisponible de lindano en suelos que han sido tratados con biosólidos, utilizando plantas de trigo como bio-indicador (Caicedo et al., 2011). Se utilizaron tres técnicas para concentrar el lindano presente en la fase acuosa, i) extracción por sorción con barra de agitación (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), ii) extracción con barras de silicona (*silicon rod extraction*, SRE) y iii) microextracción en fase sólida (SPME). En este estudio, las tres técnicas de extracción utilizaron como fase sorbente polidimetilsiloxano (PDMS, Figura 5) (Chemicalize, 2015a). La relación entre la fracción biodisponible de lindano y la fracción lixivable (7 días) a través de SBSE presentan una alta correlación ($R^2=0,9971$), indicando que este método puede ser denominado como biosimulador (Caicedo et al., 2011).

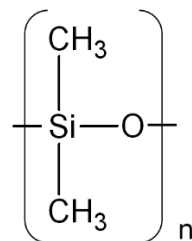


Figura 5: Estructura del polidimetilsiloxano (PDMS) (Chemicalize, 2015a).

Una nueva técnica de concentración de analitos desde muestras acuosas ha sido desarrollada por el grupo de laboratorio, denominada extracción por sorción con disco rotatorio (*rotating disk sorptive extraction*, RDSE, Figura 6) (Richter et al., 2009). Presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas de microextracción (SPME, SBSE) como: i) una alta eficiencia en la extracción, ya que posee una gran superficie de contacto entre la fase sorbente y la muestra, ii) puede alcanzar altas velocidades de agitación, por lo tanto, una mayor eficiencia en el transporte de masas al disminuir la capa estancada de agua que se forma sobre la fase, que es el paso determinante de la extracción y iii) la fase sorbente no sufre desgaste porque no entra en contacto con el vial de extracción.

El disco rotatorio es un disco de teflón que posee una barra magnética en su interior. La disposición de la fase sorbente presenta dos conformaciones, la primera de un disco plano en la que se inmovilizan fases poliméricas como PDMS (Figura 6.a) (Jachero et al., 2013) ó en láminas como C₁₈ (Figura 6.b) (Cañas and Richter, 2012) y la segunda, un disco con cavidad, donde se pueden agregar fases sorbentes en polvo como Oasis HLB® (Figura 6.c) (Cañas et al., 2014; Manzo et al., 2014).

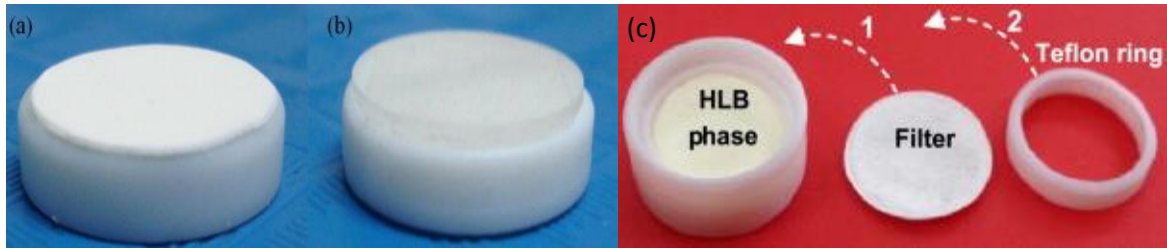


Figura 6: Conformaciones del disco (Cañas and Richter, 2012; Manzo et al., 2014).

En la Figura 7, se muestran los modos de rotación que se han utilizado con el disco rotatorio. En el primero, el disco es agitado por un agitador magnético de laboratorio en posición horizontal (7.a) y en el segundo, es accionado por una varilla que está conectada a un agitador eléctrico en posición vertical (7.b) (Jachero et al., 2014). Al comparar ambos modos de rotación a la misma velocidad, en la segunda configuración se produce una mejorada convección que hace disminuir aún más el grosor de la capa estancada de agua. Esto produce un transporte del analito más eficiente, reduciendo el tiempo de equilibrio de la extracción. A velocidades de rotación de 1250 rpm, los equilibrios de extracción son alcanzados a 80 y 30 min, para los modos de rotación horizontal y vertical, respectivamente, para la extracción de triclosán en agua (Jachero et al., 2014).

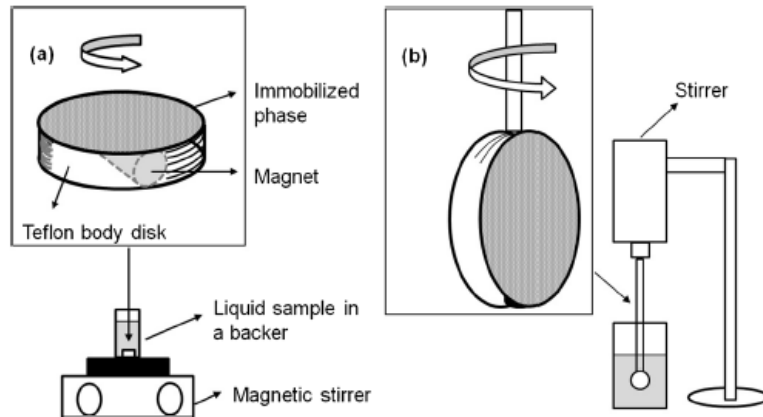


Figura 7: Modos de rotación del disco, a) modo horizontal y b) modo vertical (Jachero et al., 2014).

La extracción con disco rotatorio ha sido utilizada para determinar la biodisponibilidad de triclosán en suelos tratados con biosólido, utilizando como bio-indicador plantas de trigo (Jachero et al., 2015). Las fracciones lixiviables y biodisponibles de triclosán presentan una alta correlación entre sí ($R=0,98$), por lo que la extracción con disco rotatorio puede ser utilizada como un método biosimulador.

1.6. Fracción biodisponible y métodos biosimuladores.

La medida de la fracción biodisponible es considerada importante cuando los niveles de los contaminantes determinados en un suelo de prueba se pueden relacionar con los niveles de éstos, en un organismo vivo. Si el método empleado en la extracción se correlaciona con la concentración de los contaminantes en la planta, él o los métodos se pueden llamar biosimuladores (Lanno et al., 2004). Por lo anterior, se estudiarán dos métodos para determinar la biodisponibilidad

de triclocarbán en suelos tratados con biosólidos, utilizando plantas de trigo como bio-indicador. El primero, la extracción con hidroxipropil- β -ciclodextrina y el segundo, extracción acuosa y la posterior concentración con disco rotatorio. Si los resultados de estos métodos se correlacionan con la fracción biodisponible de triclocarbán, se podrán llamar métodos simuladores.

II. HIPÓTESIS

La fracción biodisponible de triclocarbán podría ser eficientemente medida a través de métodos simuladores como la extracción con ciclodextrina y la extracción con CaCl_2 0,001 M y concentración con disco rotatorio con fase sorbente de polidimetilsiloxano.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Desarrollar métodos simuladores y compararlos con un método biológico para interpolar la fracción biodisponible de triclocarbán en suelos tratados con biosólidos.

3.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar física y químicamente los suelos y biosólidos.
- Determinar el contenido de triclocarbán en muestras de suelos, biosólidos y suelos tratados con biosólido.
- Desarrollar un método de extracción de triclocarbán con hidroxipropil- β -ciclodextrina en los suelos tratados con biosólidos.
- Desarrollar un método de extracción de triclocarbán en solución acuosa y posterior concentración con disco rotatorio en los suelos tratados con biosólidos.
- Determinar la fracción biodisponible de triclocarbán a través de ensayos con plantas de trigo.
- Modelar los resultados obtenidos por los métodos simuladores con los resultados de la fracción biodisponible.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales, reactivos e instrumentación.

4.1.1. Estándares.

- Triclocarbán (TCC, 99,3%), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).
- Triclocarbán marcado isotópicamente ($^{13}\text{C}_{13}$ -TCC, 50 mg L⁻¹, 99%), como estándar interno, Wellington Laboratories (Ontario, Canadá).

4.1.2. Reactivos.

- Triclocarbán (TCC, 99%), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Cartuchos de SPE: cartuchos Oasis® HLB (60 mg, 3 cc), Waters (Milford, MA, USA).
- Solventes grado HPLC: acetona, acetonitrilo, metanol, *n*-hexano, acetato de etilo y diclorometano, Merck (Darmstadt, Germany), Fisher Scientific (Fair Lawn, NY, USA) ó Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Sales: cloruro de sodio (99,9%), acetato de amonio (98%) y sulfato de sodio anhidro (99%); Merck (Darmstadt, Germany) ó Fisher Scientific (Fair Lawn, NY, USA).
- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), Mw~1460, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Sylgard 184 silicone elastomer kit, para preparación de las fases sorbentes de polidimetilsiloxano (PDMS), Dow Corning (Midland, MI, USA).

- Filtros de membrana PDVF de 0,22 μm y 13 mm, Millipore (Billerica, MA, USA).
- Filtros de fibra de vidrio (GA55) de 0,6 μm y 25 mm, Advantec (Arquimed, Santiago, Chile)

4.1.3. Equipos de extracción utilizados.

- Agitador multiposición 0-2000 rpm, Jeio Tech.
- Agitador vertical RZR 2050, Heidolph.
- Ultrasonido Power Sonic 410, Hwashin Technology.
- Centrífuga Varifuge 3.0, Heraeus Sepatech.
- Agitador mecánico Promax 2020, Heidolph.

4.1.4. Software

- Origin Lab 8.0.
- Statgraphics Centurion XVI.

4.1.5. Semillas

- Semillas de trigo (*Triticum aestivum*).

4.1.6. Instrumentación cromatográfica.

La identificación cromatográfica de TCC se realizó a través de cromatografía líquida, la que se realizó en tres equipos.

4.1.6.1. HPLC-DAD.

Un cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos con software Empower (HPLC-DAD, Waters, Milford, MA, USA). La columna utilizada fue Symmetry C₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 250 mm, Waters) y precolumna Symmetry C₁₈ (5 µm, 4 mm x 20 mm, Waters). La composición de fase móvil fue de acetonitrilo y agua en modo isocrático (80% acetonitrilo y 20% agua). Se utilizó un caudal de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. El tiempo de retención (t_R) y la longitud de onda de absorción de 6,5 min y 264,2 nm, como se observa en las Figuras 8.a y 8.b, respectivamente.

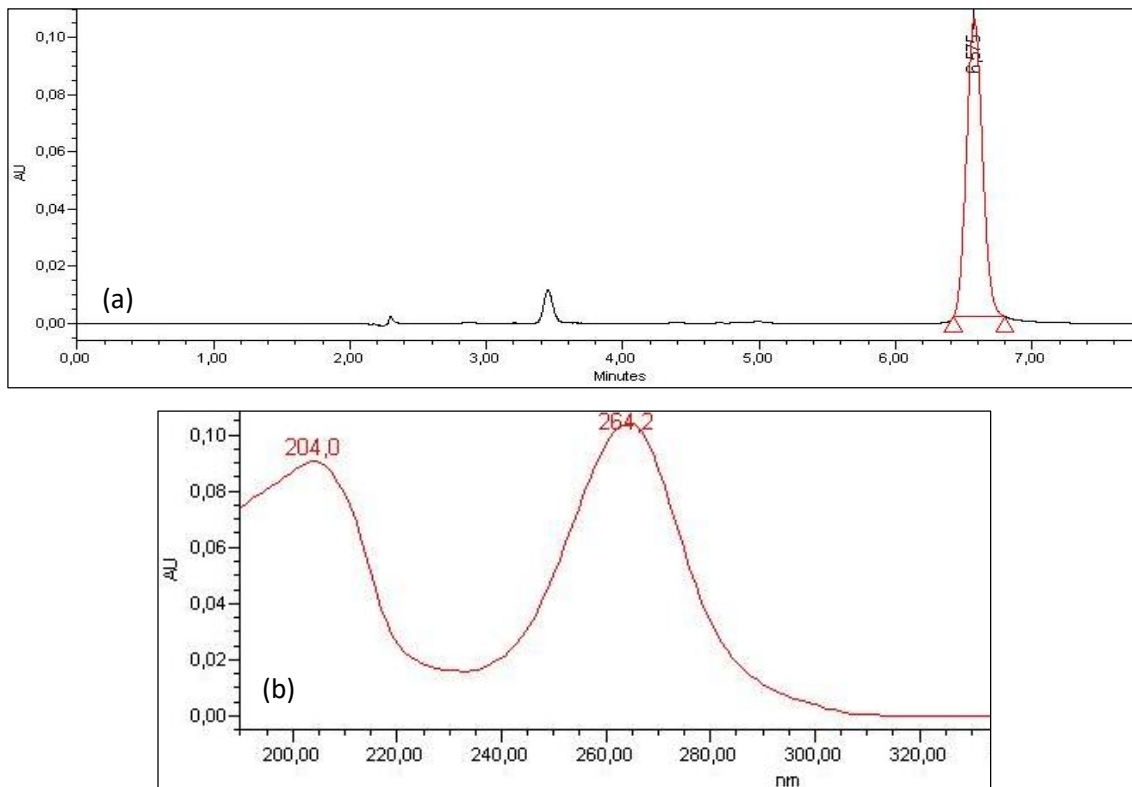


Figura 8: Cromatograma (a) y espectro de absorción (b) de TCC.

4.1.6.2. LC-MS/MS a.

Un cromatógrafo líquido acoplado a un detector selectivo de masas QTRAP con software Analyst 1,4 (LC-MS/MS, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos). La columna utilizada fue Eclipse XBD-C₁₈ (3,5 µm, 2,1 mm x 150 mm, Agilent). La composición de la fase móvil fue de 10 mM de acetato de amonio y acetonitrilo en gradiente: 5% de agua (caudal de 400 µL min⁻¹, mantenido por 1,5 min); aumentando a 100% de agua durante 2 min (caudal de 500 µL min⁻¹, mantenido por 2,5 min) y disminuyendo a 5% de agua (caudal de 400 µL min⁻¹, mantenido por 4 min); con tiempo total de análisis de 10 min y un volumen de inyección de 10 µL. Se utilizó en ionización por electrospray en modo negativo (ESI-). Las transiciones 313/160 y 313/126 (Figuras 9 y 10.a) fueron utilizadas como cuantificación y confirmación, respectivamente y el tiempo de retención (t_R) de TCC fue de 4,43 min, como se observa en la Figura 10.b.

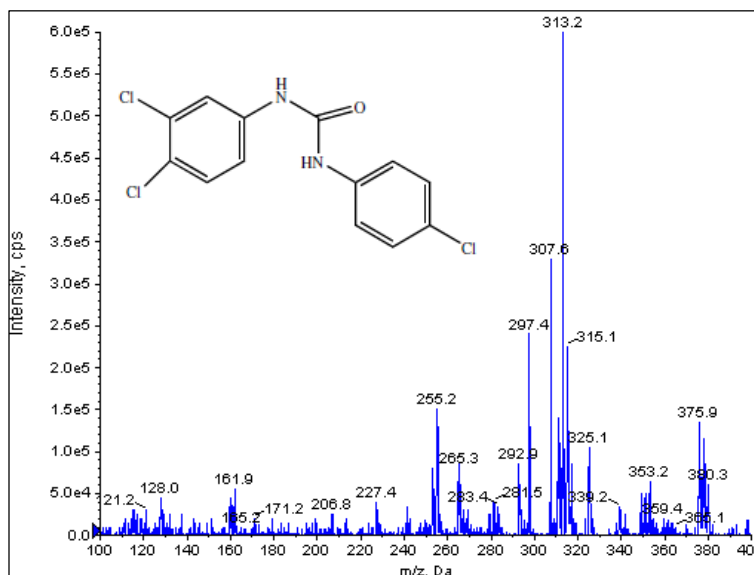


Figura 9: Espectro de masa de primer orden de TCC.

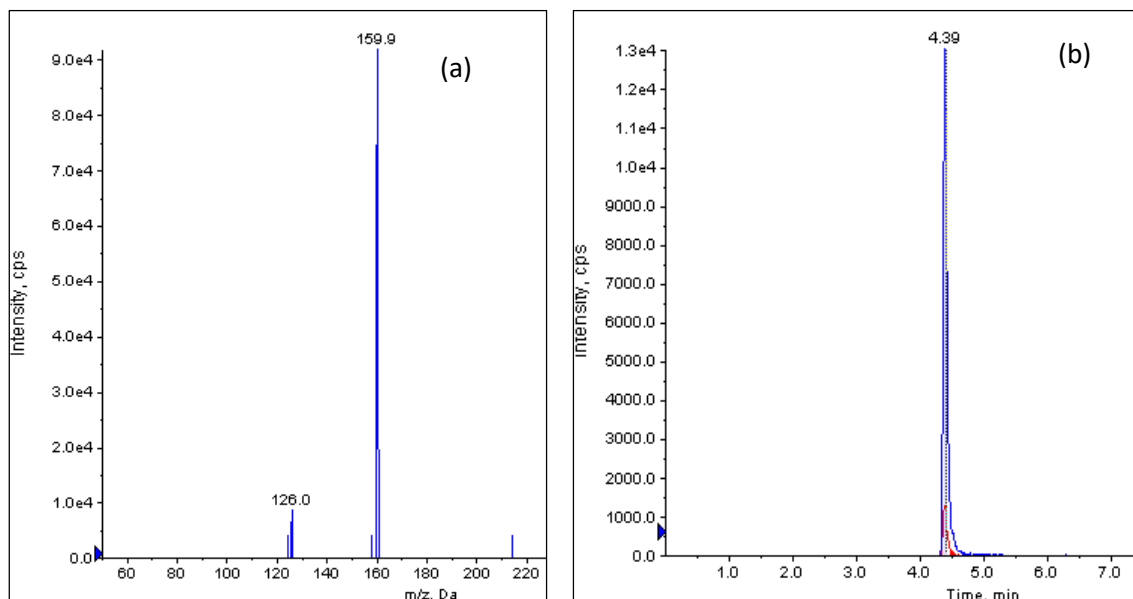


Figura 10: Espectro de masa de segundo orden (a) y cromatograma (b) de TCC.

4.1.6.3. LC-MS/MS b.

Un cromatógrafo líquido Discovery MAX-TSQ Quantum con software Xcalibur (LC-MS/MS, Thermo Scientific). La columna utilizada fue Supelcosil C₁₈ (5 µm, 4,6 mm x 25 cm, Sigma Aldrich) y precolumna Supelcosil C₁₈ Supelguard Cartridge (5 µm, 4 mm x 2 cm, Sigma Aldrich). La fase móvil fue metanol con 10 mM de acetato de amonio, caudal de 300 µL min⁻¹ y volumen de inyección de 25 µL. El tiempo de retención (t_R) de TCC de 10,78 min (Figura 11.a). Se utilizó la ionización por electrospray en modo negativo (ESI-) y TCC marcado isotópicamente (¹³C₁₃-TCC) fue utilizado como estándar interno. Las transiciones estudiadas fueron: 315/162 (TCC) y 328/168 (¹³C₁₃-TCC) para cuantificación; 313/160 (TCC) y 326/166 (¹³C₁₃-TCC) para confirmación (Figura 11.b y 12).

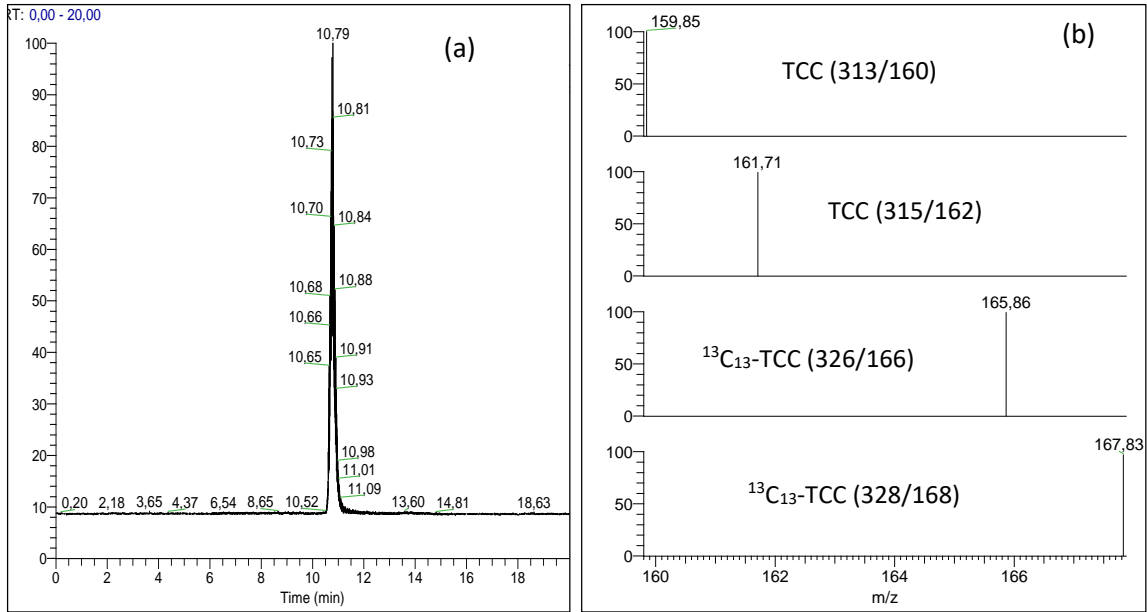


Figura 11: Cromatograma (a) y espectro de masa (b) de las transiciones de TCC y ¹³C₁₃-TCC.

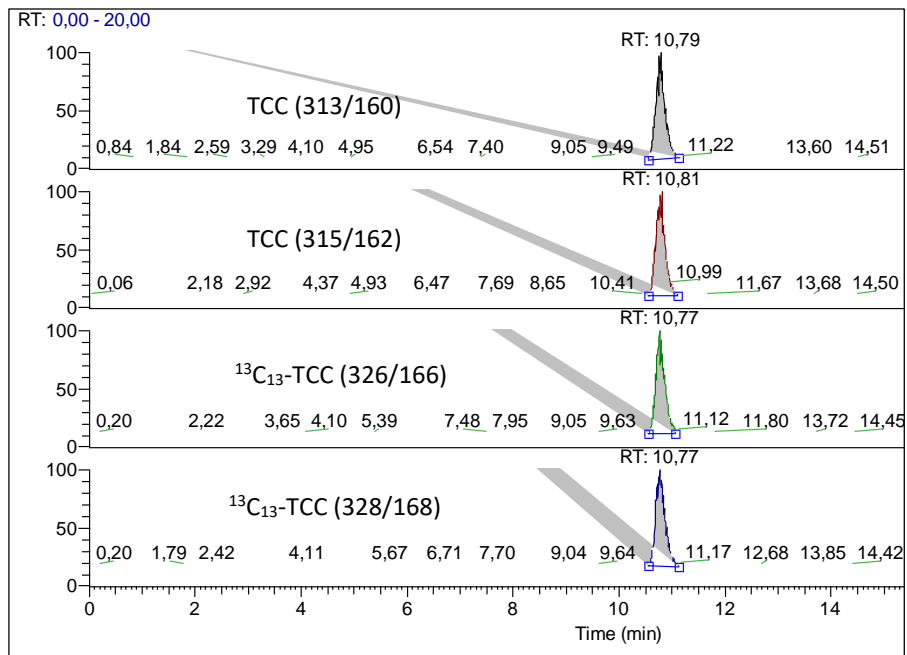


Figura 12: Cromatogramas correspondientes de TCC y ¹³C₁₃-TCC.

4.2. Suelos y biosólidos.

4.2.1. Suelos y biosólido de Chile.

El suelo Taqueral (TQ, ubicación: 33°20'41" S - 70°48'58" W) fue recolectado en la Región Metropolitana, Chile. La Serie Taqueral es un miembro de la familia fina, mixta, térmica de los *Calcic Haploxerolls* (Mollisol) (CIREN, 1996). El suelo Calle Larga (CL, ubicación: 32°50'39" S - 70°37'27" W) fue obtenido en la V Región, Chile. Este suelo pertenece a la Serie Calle Larga que es miembro de la familia mixta, fina, térmica de los *Typic Argixerolls* (Mollisol) (CIREN, 2003). En cada sitio los suelos fueron recolectados en ocho puntos a una profundidad entre 0 y 20 cm. Se tomaron muestras compuestas, se secaron al aire y se tamizaron a 2 mm. La ubicación geográfica de los suelos se muestra en Anexo 1.a.

El biosólido Los Andes (BLA) fue obtenido de una planta de tratamiento de la V Región, Chile y fue secado y tamizado a 2 mm.

4.2.2. Suelo y biosólido de Estados Unidos.

El suelo Genesee (GE, ubicación: 39°42'23" N - 85°6'31" W) fue recolectado en el estado de Indiana, Estados Unidos. La serie Genesee pertenece a la familia fina-arcillosa, mixta, superactiva, métrica *Fluventic Eutrudepts* (Inceptisol) (National Cooperative Soil Survey, 2008; Snyder et al., 2010b). La ubicación geográfica de los suelos se muestra en Anexo 1.b.

Un biosólido deshidratado y digerido anaeróbicamente (BCH) fue obtenido de una planta de tratamiento de aguas servidas de Chicago, Illinois, Estados Unidos.

4.2.3. Suelo y biosólido de Canadá.

El suelo fue obtenido desde un campo agrícola cerca de Guelph, Ontario, Canadá (GU, ubicación: 43°32'57" N - 80°12'54" W). La serie Guelph pertenece a la familia fina-arcillosa, mixta, superactiva, mésica, *Haplic Glossudalfs* (Alfisol) (Gillespie et al., 1971). La ubicación geográfica de los suelos se muestra en Anexo 1.c.

El biosólido deshidratado y digerido anaeróbicamente (BGU) fue obtenido de la planta de tratamiento de aguas servidas de la ciudad de Guelph (Prosser et al., 2014b).

4.3. Caracterización física y química de suelos y biosólidos.

4.3.1. Determinación de pH.

A 10 g de muestra, se agregan 25 mL de agua. Se agita la suspensión por 5 min a 300 rpm utilizando un agitador mecánico. Se deja reposar por 2 horas. Se realiza la lectura de pH en el sobrenadante con un electrodo de vidrio-calomelano (Sadzawka et al., 2006).

4.3.2. Determinación de carbono orgánico (CO).

Se pesa entre 1 y 2 g de muestra, se incluyen dos blancos y seis estándares de sacarosa entre 0 y 50 mg mL⁻¹. A cada muestra, se agregan 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 M y 20 mL de ácido sulfúrico, agitando la suspensión evitando puntos localizados de ebullición. Se deja reposar por 30 min. Luego, se agregan 70 mL de agua. Se deja reposar durante la noche. Se determina el cromato reducido en el sobrenadante a 600 nm (Sadzawka et al., 2006).

4.3.3. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

A 4 g de muestra, se agregan 33 mL de acetato de sodio 1N. Se agita por 5 min a 300 rpm, en agitador mecánico, se centrifuga por 20 min a 2000 rpm. Se descarta el sobrenadante. Este tratamiento se realiza cuatro veces. Se lava con 33 mL con etanol absoluto. Se sigue el procedimiento anterior tres veces. Luego, se agregan 33 mL de acetato de sodio 1N. Se sigue el procedimiento anterior tres veces y el sobrenadante se recolecta y se afora a 100 mL. El sodio intercambiado se determina por emisión atómica (Sadzawka et al., 2006).

4.3.4. Determinación de la conductividad eléctrica.

A 2 g de muestra, se agregan 100 mL de agua y se agita por 30 min en agitador mecánico. Luego, se filtra y se mide la conductividad en el filtrado (Sadzawka et al., 2006).

4.3.5. Determinación de textura: Método Bouyoucos.

A 50 g de suelo, se le agregan alrededor de 700 mL de agua y 20 mL de hexametáfosfato de sodio al 10%. Se agitó por 15 min a 300 rpm en agitador mecánico. Luego, se trasvasija a una probeta, se afora con agua y se agita por 1 min. Se coloca el termómetro y el hidrómetro en la solución, se deja reposar por 4 min. Se lee la temperatura y la lectura del hidrómetro. Se deja reposar por 2 horas más y se realizan las lecturas nuevamente. A través de las lecturas se obtienen los porcentajes de arena, arcilla y limo (Bouyoucos, 1962).

4.4. Determinación de la fracción biodisponible de TCC a través de ensayos con plantas de trigo (*Triticum aestivum*).

4.4.1. Chile.

A cada suelo (TQ y CL) se le aplicaron dos tratamientos, uno con biosólido (BLA) y otro, con biosólido enriquecido (BLA-E) con 10 mg kg⁻¹ de TCC, ambos aplicados en dosis equivalentes a 0, 30, 60, 90 y 200 Mg ha⁻¹. El cálculo de las dosis se encuentra en Anexo 2.

Las mezclas fueron preparadas individualmente y cada tratamiento en triplicado. Luego, fueron agregadas a macetas de 800 mL en donde se incubaron a capacidad de campo por tres días. Luego, en cada una de las macetas se sembraron 10 g de semillas de trigo. Un esquema de la preparación de las macetas se encuentra en el Anexo 3.

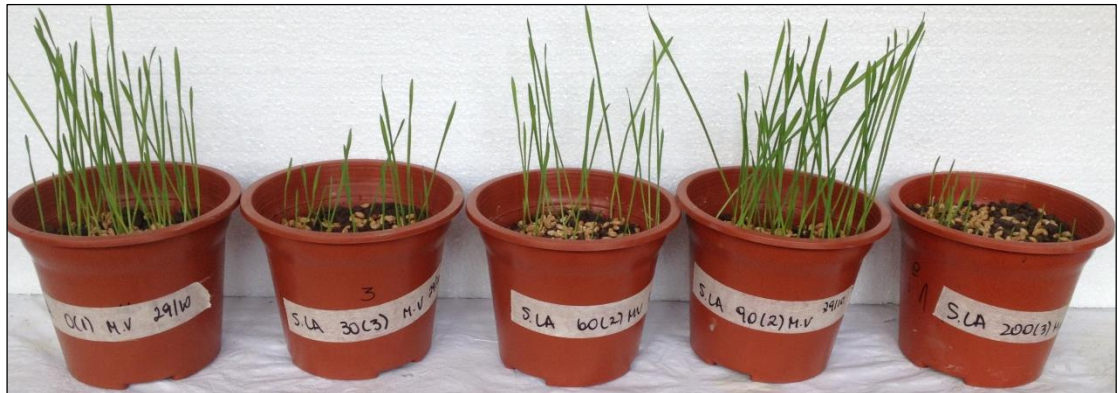


Figura 13: Estudios de biodisponibilidad de TCC en Chile.

Este bioensayo se realizó en condiciones controladas con períodos de luz día/noche de 14/10 horas y temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$ (Figura 13). Al transcurrir 30 días, las plantas de trigo fueron cosechadas (separando las raíces de la parte aérea), lavadas con agua y secadas a temperatura ambiente. El total de muestras de tejido vegetal de este bioensayo es de 120 (2 suelos x 2 tratamientos x 3 réplicas x 5 dosis x 2 tejidos).

4.4.2. Estados Unidos.

Al suelo Genesee (GE) se le aplicó un tratamiento con biosólido (BCH) en dosis equivalentes a 0, 30, 60, 90 y 200 Mg ha⁻¹. Las dosis fueron preparadas individualmente y en triplicado y en macetas de 400 mL que fueron incubadas a capacidad de campo por tres días. Luego, en cada una de las macetas, se sembraron 7 semillas de trigo, como se observa en la Figura 14.



Figura 14: Estudio de biodisponibilidad en Estados Unidos.

Este bioensayo se realizó en un invernadero (30 a 35°C). Al observar germinación de las semillas, el número inicial de 7 plantas fue disminuido al azar a 3. Al transcurrir 28 días, las plantas de trigo fueron cosechadas (separando las raíces de la parte aérea), lavadas y secadas a temperatura ambiente. El total de muestras de tejido vegetal de este bioensayo es de 30 (1 suelo x 1 tratamiento x 3 réplicas x 5 dosis x 2 tejidos).

4.4.3. Canadá (Prosser et al., 2014a).

El suelo Guelph (GU) fue tratado con un biosólido (B) que ha enriquecido con TCC en distintas concentraciones. El primer tratamiento (B-1), se realiza con B que contiene naturalmente TCC y los siguientes, con biosólido enriquecido con TCC en concentraciones nominales de 14 (B-2), 34 (B-3), 74 (B-4), 154 (B-5) y 304 mg kg⁻¹ (B-6). Además de un tratamiento control (B-C) que corresponde a suelo sin aplicación de biosólido. La dosis de biosólido se mantuvo constante para cada uno de los tratamientos, siendo calculada con el software NMAN3 y fue estimada en 21 Mg ha⁻¹.

Las macetas utilizadas fueron de 3 L y cada una de las dosis fue preparada mezclando manualmente los primeros 15 cm de suelo con el biosólido correspondiente por tres min y se incubaron 48 horas. Se sembraron 8 semillas de trigo a 30 mm de profundidad.

Este bioensayo fue realizado en un invernadero, con temperaturas entre 19 y 31°C. Al observar germinación, se disminuyó al azar el número de plantas a 5. Transcurridos 65 días, las plantas de trigo fueron cosechadas y separadas en raíces y parte aérea, secadas a 70°C. Para el estudio de biodisponibilidad, se contaba con muestras en triplicado de las raíces de las plantas de trigo para cada tratamiento (total 21 muestras).

Para todos los experimentos de biodisponibilidad, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y Tukey-HSD, con un nivel de confianza del 95% (p -value $\geq 0,05$) de las biomásas obtenidas de raíces y parte aérea para cada una de las dosis.

4.5. Optimización de método de extracción de triclocarbán.

4.5.1. Extracción en fase sólida.

Como antecedente previo, los autores Chu, Metcalfe, Ying y Kookana, desarrollaron distintas metodologías para la extracción en fase sólida de compuestos orgánicos con log K_{ow} entre 3,5 y 4,9 en muestras de biosólido, utilizando como fase sorbente Oasis® HLB (Chu and Metcalfe, 2007; Ying and Kookana, 2007). Basándose en estas metodologías, se seleccionaron las siguientes etapas para la preparación de muestras para la extracción en fase sólida.

1. Extracción de TCC desde muestras de biosólido con 4 mL de acetato de etilo (tres repeticiones). Luego, el solvente es evaporado con corriente de nitrógeno.
2. Reconstitución de la muestra en mezcla metanol y agua.
3. Acondicionamiento de los cartuchos Oasis con 3 mL de cada uno de los siguientes solventes: metanol, acetona, diclorometano y hexano, sucesivamente.
4. Carga de la muestra en el cartucho de extracción en fase sólida.

5. Lavado del cartucho con 2 mL de hexano y dos veces con 2 mL de diclorometano. Luego, el cartucho es secado y lavado nuevamente dos veces con 3 mL de agua.

6. Elución de la muestra con 3 mL de una mezcla 1:1 de metanol y acetona, tres veces.

7. El extracto fue evaporado con corriente de N₂, reconstituido con 0,5 mL de acetonitrilo y filtrado por membrana de 0,22 µm de PDVF. Los extractos fueron analizados por HPLC-DAD.

Las etapas a optimizar en este estudio, serán la de reconstitución (etapa n°2) y la etapa de elución de la muestra (etapa n°5) desde los cartuchos de extracción en fase sólida con fase sorbente Oasis HLB.

4.5.1.1. Estudio de reconstitución de la muestra.

Se realizaron ensayos de recuperación, donde una solución de 5 mg L⁻¹ de TCC es evaporada con corriente de N₂ y reconstituidas con 10 mL de mezclas metanol y agua en las proporciones 1:9 y 1:1, respectivamente. Además, se reconstituye con 10 mL de metanol. Luego, se continúa según el punto 4.5, etapa 3.

4.5.1.2. Estudio de elución de la muestra.

Una solución de 5 mg L⁻¹ de TCC fue evaporada con corriente de N₂ y reconstituida con 10 mL de una mezcla 1:1 de metanol y agua. Las etapas 2, 3,

4 y 5 fueron realizadas según el punto 4.5. La etapa de elución fue estudiada utilizando distintos disolventes como acetonitrilo, acetona, acetato de etilo y diclorometano; y una mezcla 1:1 de metanol y acetona. La elución se realiza en tres etapas cada una con 3 mL de cada uno de los disolventes descritos previamente. Luego, se continúa según el punto 4.5, etapa 7.

4.6. Determinación de TCC en suelos, biosólidos, suelos tratados con biosólido y tejido vegetal.

En un tubo de centrifuga se pesaron 0,5 g de muestra (suelo, biosólido, suelo tratado con biosólido y tejido vegetal, Figura 15) y se agregaron 4 mL de acetato de etilo. Luego, se extrajo por 15 min con ultrasonido a 50°C y se centrifugó por 15 min a 2000 rpm y se recolectó el sobrenadante (Ying and Kookana, 2007). Este tratamiento se realizó tres veces. Los extractos combinados fueron evaporados con corriente de N₂ y redissueltos en 10 mL de una mezcla 1:1 de metanol y agua.

La limpieza del extracto fue realizada por SPE utilizando la fase sorbente Oasis[®] HLB (60 mg, 3 mL) y un *manifold* de extracción, según metodología optimizada (Figura 16). El acondicionamiento de la fase sorbente se realizó sucesivamente con 3 mL de los siguientes solventes: metanol, acetona, diclorometano y hexano. Se agregó el extracto redissuelto (10 mL) y se lavó dos veces con 2 mL de hexano, se secó y se adicionaron dos veces 2 mL de agua.

La elución se realizó con 3 alícuotas de 3 mL de una mezcla 1:1 de metanol y acetona.

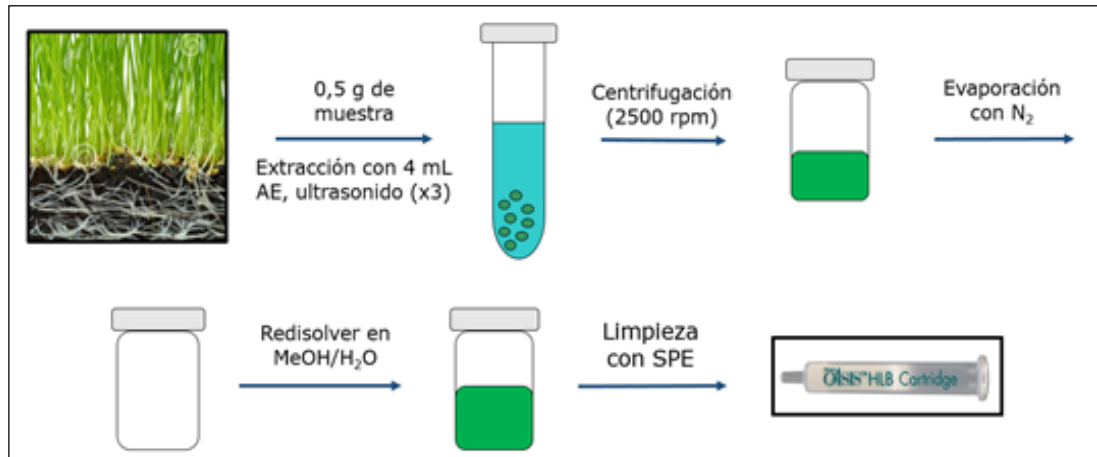


Figura 15: Esquema de extracción de TCC desde tejido vegetal.

Luego, el extracto limpio fue evaporado con corriente de N₂, reconstituido con 0,5 mL de acetonitrilo y filtrado por membrana de 0,22 µm de PDVF. Los extractos fueron analizados por LC-MS.

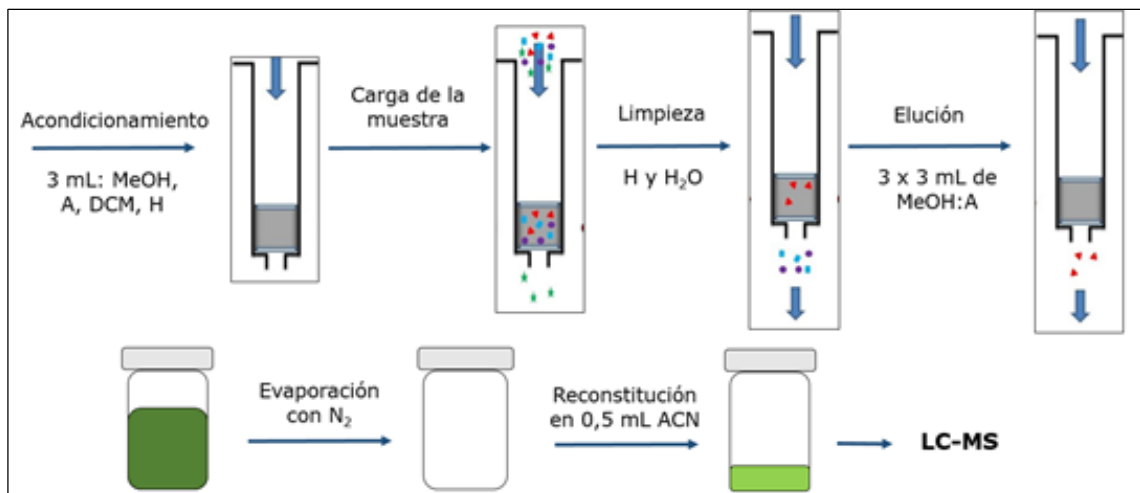


Figura 16: Esquema de la limpieza de las muestras.

4.7. Desarrollo de métodos biosimuladores de triclocarbán en suelos tratados con biosólidos.

4.7.1. Optimización del método de extracción de triclocarbán con HP- β -CD.

Los autores Wong y Bidleman (2010), desarrollaron una metodología para la extracción no exhaustiva de pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados en suelos pantanosos; donde utilizan la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) como agente extractante (Wong and Bidleman, 2010). Brevemente, se describen las etapas de esta metodología.

1. A 1 g de suelo se le agregaron 10 mL de una solución 50 mM de HP- β -CD y fue agitada por 20 horas, centrifugado a 2500 rpm por 30 min y el sobrenadante fue filtrado a través de fibra de vidrio.
2. A la solución con HP- β -CD, se agregaron 10 mL de metanol se sonicó por una hora y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 24 horas.
3. La solución HP- β -CD/metanol, fue extraída tres veces con 10 mL de hexano, a través de extracción líquido-líquido. Los extractos fueron combinados y secados con corriente de N₂.
4. Análisis de la muestra por LC-MS.

Las etapas a optimizar en este estudio, serán la de extracción líquido-líquido, parte de la etapa n°3 y el tiempo de agitación del suelo con la solución acuosa de HP-β-CD que es parte de la etapa n°1.

4.7.1.1. Optimización de la extracción líquido-líquido.

Se realizaron ensayos de recuperación, donde a una solución de 2 mg L⁻¹ de TCC, se agregaron 10 mL de una solución 50 mM de HP-β-CD. Ambas fueron agitadas por 3 horas para continuar con las etapas 1 y 2, como se indicó anteriormente en el punto 4.7.1.

Se estudiaron como disolventes de extracción: hexano, acetato de etilo y diclorometano; y las siguientes mezclas 1:1 de: diclorometano/acetato de etilo, hexano/acetato de etilo y diclorometano/hexano. Con estos disolventes y mezclas, se realizó la extracción desde la solución HP-β-CD/metanol con 10 mL por agitación con vórtex durante 1 min y centrifugación a 2000 rpm por 5 min. Este procedimiento se realizó tres veces, los extractos fueron combinados y filtrados con sulfato de sodio anhidro.

Los extractos orgánicos fueron recolectados, evaporados con corriente de N₂, reconstituidos en 0,5 mL de acetonitrilo, filtrados por membrana de 0,22 μm de PDVF y analizados por HPLC-DAD.

4.7.1.2. Optimización del tiempo de agitación suelo-HP- β -CD.

A 1 g de suelo tratado con biosólido enriquecido con TCC, en una dosis de 90 Mg ha⁻¹, se agregaron 10 mL de una solución 50 mM de HP- β -CD. El tiempo de agitación entre el suelo y la solución de HP- β -CD fue estudiado entre los 15 y 300 min. Se siguen los procedimientos de la etapa 1 y 2 del punto 4.7.1.

Luego, se realizó la extracción con 10 mL de una mezcla 1:1 de diclorometano/acetato de etilo por agitación con vórtex por 1 min y centrifugación por 5 min a 2000 rpm. La extracción fue realizada tres veces y se continuó con el procedimiento realizado en el punto 4.7.1.1.

4.7.2. Optimización de la extracción de triclocarbán con disco rotatorio desde muestras acuosas.

No existen estudios para la extracción de TCC con disco rotatorio, por lo tanto, se toma como referencia el estudio realizado por Jachero y colaboradores(Jachero et al., 2013)(Jachero et al., 2013), para la extracción de triclosán con disco rotatorio desde muestras acuosas (Jachero et al., 2013).

Para la optimización de la metodología se realizó un diseño de experimentos para el estudio de variables de los procesos de extracción y desorción de TCC. Para ello, se utilizan fases de 200 mg de polidimetilsiloxano (PDMS) y soluciones acuosas de 10 μ g L⁻¹ de TCC.

4.7.2.1. Variables de extracción.

Se utilizó un diseño factorial de 3 niveles (3^2) de 12 experimentos para estudiar el efecto que posee la adición de cloruro de sodio y metanol, en porcentajes p/v y v/v, respectivamente (Tabla 3). La extracción fue realizada con 25 mL de muestra dopada con una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCC, con una velocidad de rotación del disco de 2000 rpm durante 2 horas.

Tabla 3: Variables codificadas para la extracción.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
NaCl (%)	0	10	20
MeOH (%)	0	10	20

Luego, se realizó una desorción con 10 mL de metanol por 60 min, con una velocidad de agitación de 1500 rpm. El extracto fue evaporado con corriente de N_2 , reconstituidos en 0,5 mL de acetonitrilo, filtrados por membrana de $0,22 \mu\text{m}$ de PDVF y analizados por HPLC-DAD.

4.7.2.2. Variables de desorción.

La extracción se realizó con 25 mL de muestra enriquecida con una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCC, con una velocidad de rotación del disco de 2000 rpm durante 2 horas.

Como factores de desorción, se estudió el volumen de metanol a utilizar y el tiempo de desorción (Tabla 4), a una velocidad de rotación de 1500 rpm, con un diseño factorial de 3 niveles (3^2) de 12 experimentos mediante una matriz de diseño de experimentos. Se continúa como en el punto 4.7.2.1.

Tabla 4: Factores evaluados para la desorción.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
MeOH (mL)	5	10	15
Tiempo (min)	15	30	45

4.7.2.3. Número de etapas de desorción.

Posteriormente se estudió el número de etapas necesarias para la desorción, ya que existen estudios previos donde se observan diferencias significativas entre una o dos etapas de desorción utilizando compuestos con $\log K_{OW}$ entre 3 y 5 (Manzo et al., 2014).

La extracción se realizó con 25 mL de muestra enriquecida con una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de TCC, con una velocidad de rotación del disco de 2000 rpm durante 2 horas. Para la desorción, se estudió el número de etapas, entre una y dos. Cabe destacar que para ambas, el volumen total de metanol y el tiempo total de extracción son 10 mL y 30 min, respectivamente (Tabla 5). La metodología sigue como en el punto 4.7.2.1.

Tabla 5: Número de etapas de la desorción.

Factores	Etapas	
	1	2
MeOH (mL)	10	5
Tiempo (min)	30	15

4.7.2.4. Estudio de variables generales para RDSE.

Como variables generales para la extracción con disco rotatorio, se estudiaron: la velocidad de rotación del disco (para la extracción) entre 200 y 2000 rpm, efecto del volumen de muestra, realizando extracciones con 25 y 50 mL de muestra, pH entre 2 y 12; y se realizó un perfil de extracción entre 5 a 120 min.

4.7.2.5. Ensayos de recuperación de TCC.

Para validar el método desarrollado, se realizaron ensayos de recuperación de triclocarbán en agua potable, con concentraciones entre 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Además, con el ensayo de recuperación de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=6), se realizaron los ensayos para determinar los límites de detección y cuantificación de la extracción con disco rotatorio de TCC.

4.8. Aplicación de métodos simuladores a los suelos tratados con biosólido.

4.8.1. Método simulador: tratamiento con HP- β -CD.

En un tubo de centrifuga se pesó 1 gramo de suelo tratado con biosólido al que se agregaron 10 mL de una solución 50 mM de HP- β -CD y se agitó mecánicamente a 300 rpm por una hora (Figura 17). Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm y el sobrenadante fue filtrado con fibra de vidrio; se agregó 10 mL de metanol, se colocó en baño de ultrasonido por una hora a 50°C y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente (20 \pm 3°C). Al día siguiente, esta solución se extrajo con 10 mL de una mezcla de diclorometano y acetato de etilo 1:1, se agitó 1 min con vórtex y se centrifugó por 5 min a 2000 rpm. Este procedimiento se llevó a cabo en triplicado y el extracto orgánico fue colectado, evaporado con corriente de N₂, reconstituido en 0,5 mL de acetonitrilo, filtrado por membrana de 0,22 μ m de PDVF y analizados por HPLC-DAD ó LC-MS, dependiendo del nivel de concentración de la muestra.

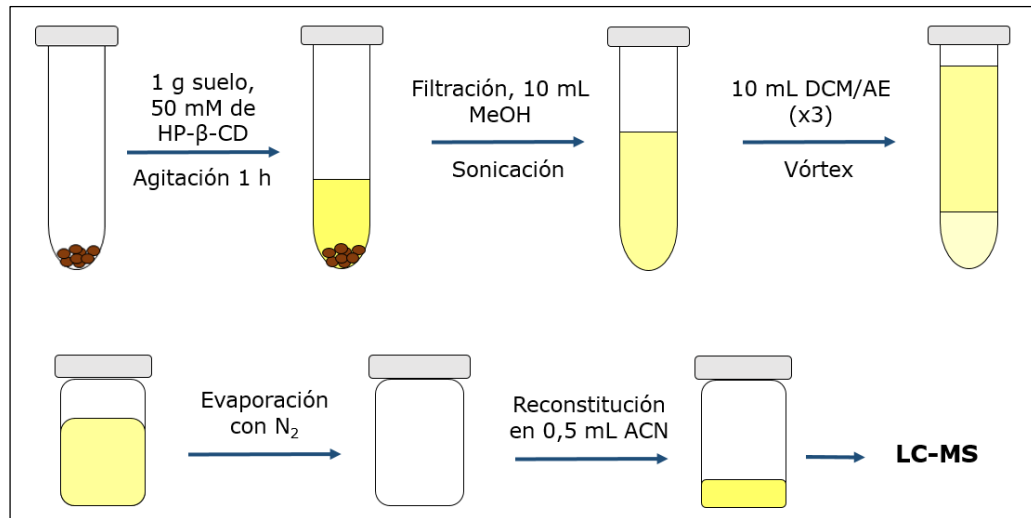


Figura 17: Esquema del método simulador: tratamiento con HP-β-CD.

4.8.2. Método simulador: tratamiento con CaCl₂ 0,001 M y concentración con RDSE (EA/RDSE).

4.8.2.1. Método de rotación horizontal (EA/RDSEh).

En un tubo de centrífuga se pesaron 12,5 gramos de los suelos tratados con biosólido (GE-BCH y GU-BGU), a los que se le agregaron 25 mL de una solución 0,001 M de cloruro de calcio y se agitó a 300 rpm por tres horas (Jachero et al., 2015). Luego, fue centrifugado a 2000 rpm y filtrado por fibra de vidrio, hasta obtener el mayor volumen posible de sobrenadante (Figura 18).

La extracción con disco rotatorio (RDSE) se llevó a cabo en modo horizontal de rotación (Jachero et al., 2014). A un vial de extracción, se le agregó el sobrenadante filtrado y el disco rotatorio; es agitado por una hora a 2000 rpm a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$). La desorción fue realizada con 10 mL de

metanol, agitación por 30 min a 1500 rpm. Luego, el solvente fue evaporado con corriente de N₂ y reconstituido con 0,5 mL de acetonitrilo, filtrado por membrana de 0,22 µm de PDVF y analizados por LC-MS.

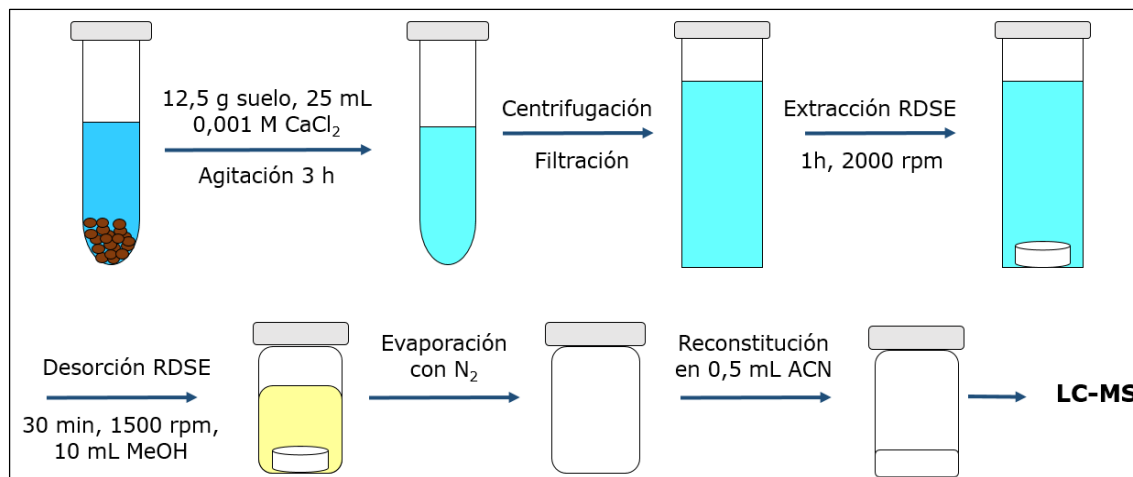


Figura 18: Esquema del método simulador: EA/RDSE horizontal.

4.8.2.2. Método de rotación vertical (EA/RDSEv).

En un vaso de precipitado se pesaron 12,5 g de suelo tratado con biosólido (TQ-BLAE y CL-BLAE) y se agregaron 25 mL de solución 0,001 M de CaCl₂. La extracción se realizó de manera simultánea utilizando el modo vertical de rotación del disco rotatorio (Jachero et al., 2014), con velocidad de agitación fue de 100 rpm, para evitar la pérdida de muestra (Figura 19). La desorción se realizó con 10 mL de metanol, agitación por 30 min a 1500 rpm. Luego, el solvente fue evaporado con corriente de N₂, reconstituido con 0,5 mL de acetonitrilo, filtrado por membrana de 0,22 µm de PDVF y analizados por LC-MS.

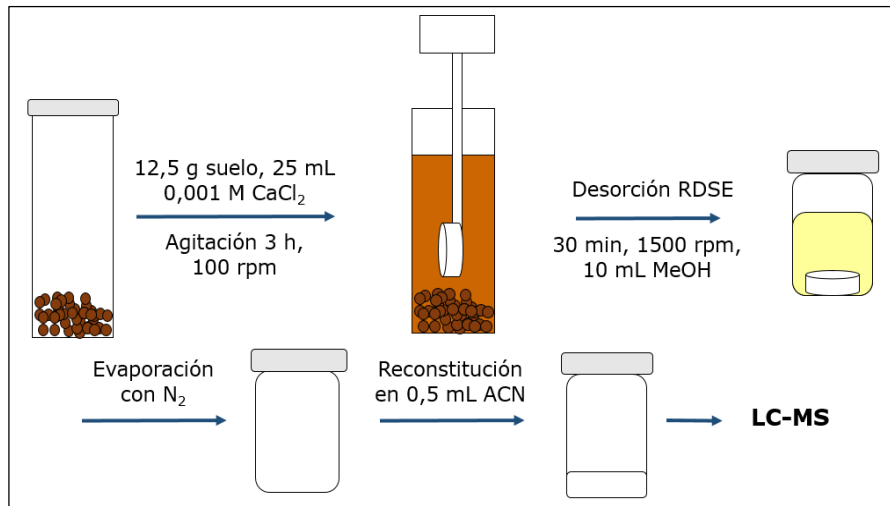


Figura 19: Esquema del método simulador: EA/RDSE vertical.

4.9. Modelamiento de la fracción biodisponible de TCC con las fracciones obtenidas por los métodos simuladores.

Se realizó un análisis de correlación simple utilizando el software Statgraphics. Los valores aceptados para el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,75 ($R > 0,75$) y tener una significancia del 95% ($p\text{-value} < 0,05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Características físicas y químicas de los suelos y biosólidos en estudio.

En la Tabla 6, se observan las características físicas y químicas de los suelos estudiados. Los suelos TQ y CL presentan pH neutro, mientras que el del suelo GE es moderadamente ácido y en cambio, el del suelo GU es alcalino. Los porcentajes de carbono orgánico (%CO) de los suelos varían entre 1,6 y 2,3; presentando el siguiente orden: CL<GU<TQ<GE. Las capacidades de intercambio catiónico (CIC) varían entre 13 y 18 cmol kg⁻¹. Según las texturas, los suelos CL y GE se agrupan en la clase textural franco-arcillo-limosa, la del suelo TQ corresponde a franca-limosa en cambio la del suelo GU es Franca.

Tabla 6: Características físicas y químicas de los suelos.

Característica	Suelos			
	TQ	CL	GE	GU
pH	7,0	6,7	6,4	7,9
C _{org} (%)	2,1	1,6	2,3	1,8
CIC (cmol kg ⁻¹)	13	18	n.d	14,1
Arcilla (%)	12-27	20-35	27-40	7-27
Limo (%)	50-80	<28	40-60	28-50
Arena (%)	-	≥45	<20	<52
Textura	Franca-limosa	Franco-arcillo-limosa	Franco-arcillo-limosa	Franca

n.d: no determinado

Las características químicas de los biosólidos se observan en la Tabla 7. El BLA presenta un pH moderadamente ácido, mientras que BCH y BGU son moderadamente alcalinos. Los biosólidos BLA y BGU presentaron un contenido de carbono orgánico (%CO) cercanos al 33% y el BCH contiene un 43%, aproximadamente 15 a 25 veces más alto de lo que contienen los suelos estudiados. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) de BLA es 2,5 veces más que la de los suelos estudiados, cabe destacar que no se determinó la CIC para los otros dos biosólidos. Los valores de conductividad eléctrica de los biosólidos estuvieron entre 2,4 y 2,7 mS/cm.

Tabla 7: Características físicas y químicas de biosólidos.

Característica	BLA	BCH	BGU
pH	5,8	8,0	7,8
C _{org} (%)	33,7	43,0	32,3
CIC (cmol kg ⁻¹)	51	n.d	n.d
Conductividad eléctrica (mS/cm)	2,7	n.d	2,4

n.d: no determinado

5.2. Optimización del método de extracción de triclocarbán.

5.2.1. Extracción en fase sólida de triclocarbán.

Las etapas a optimizar de la extracción en fase sólida, fueron la reconstitución del extracto antes de realizar la extracción en fase sólida y la elución de la muestra, luego de la limpieza con la fase sorbente Oasis HLB, como se indica en el punto 4.5.

5.2.1. Etapa de reconstitución de la muestra.

Debido a que el acondicionamiento del cartucho, se realiza en un orden decreciente de polaridad, la muestra debe ser reconstituida en un disolvente o mezcla que presente una mediana polaridad. En la Tabla 8, se observa que las recuperaciones son cuantitativas cuando se utilizan mezclas de metanol y agua, ya que al agregar el agua, la mezcla presenta una mayor polaridad, que sólo utilizando metanol. Al agregar por parte iguales metanol y agua, se obtiene la mayor recuperación.

Tabla 8: Estudio de recuperación de TCC de la etapa de reconstitución.

Muestra	Mezcla de reconstitución metanol:agua	Recuperación (%)
1	1: 9	78,5 ± 0,8
2	1:1	96,91 ± 0,09
3	1:0	7,3 ± 0,2

5.2.2. Etapa de elución de la muestra.

La elución de la muestra se realizó luego de dos limpiezas de la muestra (que se encuentra en el cartucho), una con hexano y otra con agua, con secado del cartucho utilizando vacío entre ambas limpiezas. Con ellas, se eliminaron las interferencias tanto apolares y como muy polares. Por lo tanto, la elución debe realizarse con un disolvente o mezcla que posea una polaridad intermedia. El orden creciente de las polaridades de los solventes utilizados es:

diclorometano<acetato de etilo<acetona<metanol<acetonitrilo, por lo tanto, los disolventes acetona y metanol, tienen polaridades medias, lo que se comprueba con los valores obtenidos de la Tabla 9. La mezcla metanol y acetona 1:1 fue la seleccionada para realizar la elución de la muestra, ya que presenta la mayor recuperación.

Tabla 9: Estudio de recuperación en la etapa de elución.

Muestra	Elución (3 x 3 mL)	Recuperación (%)
1	Metanol: acetona 1:1	96,91 ± 0,09
2	Acetonitrilo	67 ± 1
3	Acetona	75 ± 1
4	Acetato de etilo	27,6 ± 0,4
5	Diclorometano	22,8 ± 0,5

5.3. Determinación del contenido de triclocarbán.

5.3.1. Contenido de triclocarbán en suelos y biosólidos.

En la Tabla 10, se muestran las concentraciones de TCC determinadas en los suelos y biosólidos estudiados. En los suelos TQ, CL y GU, TCC no fue detectado, en cambio en el suelo GE se encontró en una concentración de 0,06 mg kg⁻¹. En los biosólidos utilizados, las concentraciones varían desde 0,57 mg kg⁻¹ en BLA a 25 mg kg⁻¹ en BCH.

Tabla 10: Concentración de TCC en suelo y biosólido.

Muestra	Concentración de TCC (mg kg⁻¹)
GE	0,06 ± 0,01
BLA	0,57 ± 0,01
BCH	25,8 ± 0,3
BGU	3,5 ± 0,2

5.2.2. Contenido de triclocarbán en los sistemas suelo-biosólido.

Al analizar los sistemas suelo-biosólido TQ-BLA y CL-BLA, se encontró que los valores experimentales de las concentraciones de TCC están dentro de los rangos establecidos por los valores nominales. Estos últimos fueron calculados con la concentración de TCC en los biosólidos y el peso total de suelo más biosólido que corresponde a cada dosis. Para el sistema suelo-biosólido GE-BCH, las concentraciones determinadas experimentalmente, se encuentran dentro del rango del valor nominal. Cabe destacar que para cada una de las dosis, las desviaciones estándares relativas son iguales o menores al 15%, por lo que, el procedimiento de preparación de las dosis, minimiza la heterogeneidad de las muestras (Tabla 11).

Tabla 11: Concentración de TCC en suelos tratados con BLA y BCH.

Dosis (Mg ha ⁻¹)	Concentración de TCC [$\mu\text{g kg}^{-1}$]					
	TQ-BLA		CL-BLA		GE-BCH	
	Nom	Exp	Nom	Exp	Nom	Exp
0	0	n.d	0	n.d	0	58 \pm 14 (24)
30	8	7 \pm 1 (14)	8	8 \pm 1 (12)	499	487 \pm 14 (3)
60	15	11 \pm 3 (8)	16	16 \pm 0,4 (2)	978	1011 \pm 50 (5)
90	23	24 \pm 4 (16)	24	26 \pm 0,7 (3)	1440	1477 \pm 217 (15)
200	48	46 \pm 6 (13)	50	53 \pm 4 (8)	2996	2989 \pm 288 (10)

n.d: no detectado, DER en paréntesis

En la Tabla 12, se observan las concentraciones experimentales para los sistemas suelo-biosólido TQ-BLA-E y CL-BLA-E, donde se determinó entre 79-85% y 73-81% del TCC nominal para cada sistema, respectivamente.

Tabla 12: Concentración de TCC en suelos tratados con BLA-E.

Dosis (Mg ha ⁻¹)	Concentración de TCC [$\mu\text{g kg}^{-1}$]			
	TQ-BLA-E		CL-BLA-E	
	Nominal	Experimental	Nominal	Experimental
0	0	n.d	0	n.d
30	144	114 \pm 22 (19)	152	112 \pm 15 (13)
60	283	243 \pm 28 (12)	300	229 \pm 25 (11)
90	419	335 \pm 47 (14)	444	362 \pm 38 (10)
200	889	736 \pm 21 (3)	939	748 \pm 64 (8)

n.d: no detectado, DER en paréntesis

Para el sistema suelo-biosólido GU-BGU, se determinó experimentalmente entre un 81 y un 103% del TCC nominal en los seis tratamientos (Tabla 13). Cabe

destacar las altas desviaciones estándar que presenta este sistema, ya que la preparación de las dosis se realizó mezclando a mano los primeros 15 cm de suelo con el biosólido, se utilizaron macetas de mayor volumen y el tiempo de estabilización del biosólido enriquecido fue mucho menor que en los estudios realizados en Chile (Prosser et al., 2014a).

Tabla 13: Concentración de TCC en sistema tratado con BGU
(Prosser et al., 2014a).

Tratamiento	Concentración de TCC [$\mu\text{g kg}^{-1}$]	
	GU-BGU	
	Nominal	Experimental
C	0	n.d
B-1	42	35 \pm 18 (51)
B-2	164	137 \pm 65 (47)
B-3	399	324 \pm 108 (33)
B-4	868	770 \pm 197 (25)
B-5	1806	1873 \pm 246 (13)
B-6	3565	3133 \pm 1520 (48)

n.d: no detectado, DER en paréntesis

Para los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GU-BGU (Tablas 12 y 13), se observa que existen altas desviaciones estándares y coeficientes de variación al compararlas con los sistemas con biosólido sin enriquecer. Las razones pueden ser variadas, desde problemas con el proceso de enriquecimiento del biosólido con TCC como: i) tiempo de estabilización del biosólido luego de enriquecer, ii) concentración de TCC utilizado en el enriquecimiento, iii) sí el TCC se agrega

en un sistema estático o dinámico (por agitación), iv) contenido de materia orgánica del biosólido; hasta la biotransformación de TCC en una dechlorinación reductiva anaeróbica producida por bacterias a carbanilidas menos cloradas (Higgins et al., 2009; Venkatesan et al., 2012; Wu et al., 2010).

5.3. Determinación de la fracción biodisponible de triclocarbán a través de cultivos de plantas de trigo.

5.3.1. Biomasa de las plantas de trigo en los distintos sistemas.

En las plantas cultivadas en los sistemas suelo-biosólido TQ-BLA y TQ-BLA-E, no se observó una relación entre la dosis y la masa obtenida tanto en la parte aérea como en la raíz, ya que no se observan diferencias significativas (Tabla 14). El ANOVA, que indica que no existen diferencias significativas entre las dosis estudiadas, lo que fue corroborado con análisis Tukey que indica sólo un grupo homogéneo de distribución. Al comparar las biomásas obtenidas en los tratamientos realizados con BLA y BLA-E tanto para la raíz como las partes aéreas, los análisis ANOVA y Tukey indican que no existen diferencias significativas entre ellos y forman un grupo homogéneo de distribución (p -value $\geq 0,05$).

Tabla 14: Biomosas de las plantas cultivadas en el suelo TQ.

Dosis (Mg ha ⁻¹)	TQ-BLA		TQ-BLA-E	
	Parte aérea (g) ^a	Raíz (g) ^b	Parte aérea (g) ^c	Raíz (g) ^d
0	1,0 ± 0,1	0,341 ± 0,005	0,87 ± 0,09	0,28 ± 0,05
30	1,0 ± 0,3	0,35 ± 0,07	0,9 ± 0,1	0,30 ± 0,05
60	1,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,25 ± 0,09
90	0,8 ± 0,1	0,26 ± 0,05	1,0 ± 0,3	0,29 ± 0,06
200	1,0 ± 0,3	0,22 ± 0,04	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1

p-value: ^a:0,2662; ^b:0,1498; ^c: 0,4801; ^d: 0,8830

En la Tabla 15, se muestran las biomosas obtenidas para las plantas cultivadas en los sistemas suelo-biosólido CL-BLA y CL-BLA-E. Al aumentar la dosis de biosólido, la masa de la raíz y de la parte aérea se mantiene constante, hasta la dosis 200 Mg ha⁻¹, donde ambas disminuyen. Para el sistema CL-BLA, los análisis ANOVA y Tukey indican que no existen diferencias significativas y sólo un grupo de distribución entre las biomosas y las dosis estudiadas. En cambio, para el sistema CL-BLA-E, se observa una disminución constante en la biomasa (a excepción de la raíz en la dosis 200 Mg ha⁻¹). El análisis ANOVA indica que al aumentar la dosis de biosólido existen diferencias significativas entre las biomosas tanto de la raíz como de la parte aérea. El análisis Tukey señala que estas diferencias se encuentran en las dosis 0 y 90 Mg ha⁻¹ y 0 y 200 Mg ha⁻¹, para las raíces y la parte aérea, respectivamente, además indica que existen tres grupos de distribución. Al comparar las biomosas obtenidas en los tratamientos con BLA y BLA-E tanto para la raíz como las partes aéreas, los

análisis ANOVA y Tukey indican que no existen diferencias significativas al 95% de confianza y sólo un grupo homogéneo de distribución.

Tabla 15: Biomosas de las plantas cultivadas en el suelo CL.

Dosis (Mg ha ⁻¹)	CL-BLA		CL-BLA-E	
	Parte aérea (g) ^a	Raíz (g) ^b	Parte aérea (g) ^c	Raíz (g) ^d
0	1,00 ± 0,09	0,29 ± 0,03	1,0 ± 0,2*	0,3 ± 0,1*
30	0,8 ± 0,2	0,28 ± 0,05	0,86 ± 0,08*,**	0,26 ± 0,04*,**
60	0,9 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,76 ± 0,08*,**	0,22 ± 0,08*,**
90	1,0 ± 0,07	0,24 ± 0,04	0,5 ± 0,2**	0,14 ± 0,05*,**
200	0,48 ± 0,06	0,0572 ± 0,0001	0,61 ± 0,06*,**	0,086 ± 0,008**

p-value: ^a:0,1600; ^b:0,1127; ^c: 0,0150; ^d: 0,0158, *: Análisis Tukey

Para el sistema suelo-biosólido GE-BCH, se observó una masa constante en las dosis intermedias para la parte aérea y para la raíz, excepto en las dosis 0 y 200 Mg ha⁻¹ (Tabla 16). Tanto el análisis ANOVA y Tukey indican que no existen diferencias significativas entre las biomosas al aumentar la dosis de biosólido, además forman un grupo homogéneo de distribución.

Tabla 16: Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo GE.

Dosis (Mg ha ⁻¹)	GE-BCH	
	Parte aérea (g) ^a	Raíz (g) ^b
0	0,25 ± 0,02	0,022 ± 0,002
30	0,35 ± 0,05	0,038 ± 0,009
60	0,34 ± 0,06	0,03 ± 0,01
90	0,3 ± 0,1	0,03 ± 0,02
200	0,41 ± 0,07	0,051 ± 0,006

p-value: ^a:0,1873; ^b:0,0826

En la Tabla 17, se muestran las masas de las raíces cultivadas en el sistema suelo-biosólido GU-BGU, con un comportamiento constante. Tanto el análisis ANOVA y Tukey, indican que no hay diferencias significativas en un nivel del 95% de confianza y un grupo homogéneo de distribución.

Tabla 17: Biomasa de las plantas cultivadas en el suelo GU.

Dosis (Mg ha⁻¹)	GU-BGU
	Raíz (g)
C	0,018 ± 0,009
B-1	0,02 ± 0,006
B-2	0,031 ± 0,01
B-3	0,021 ± 0,003
B-4	0,02 ± 0,01
B-5	0,02 ± 0,01
B-6	0,024 ± 0,003

p-value: ^a:0,4305

En general, la aplicación de triclocarbán como parte de los biosólidos y biosólidos enriquecidos, solo presenta efectos significativos en las biomásas de las plantas de trigo en suelos con bajos porcentajes de carbono orgánico y con un alto porcentaje de arena (gran tamaño de partícula), como es el suelo Calle Larga.

El efecto que presenta la aplicación de biosólidos a los suelos en las biomásas de diferentes plantas ha sido investigado. En un estudio, donde tres PPCPs fueron estudiados (carbamazepina, difenhidramina y triclocarbán) y aplicados en

los biosólidos, las biomásas de las partes aéreas fueron afectadas significativamente en las plantas de lechuga y rábano (p -value $<0,05$); a diferencia de las otras plantas del estudio (pimiento, coliflor y tomate), para las cuáles no se determinaron diferencias significativas (Wu et al., 2012).

La aplicación de concentraciones de triclocarbán como parte de los biosólidos en suelos, afecta significativamente las biomásas de la parte aérea de plantas de trigo en dicho sistema. La masa de la parte aérea aumenta en los tratamientos con concentraciones crecientes de TCC, al compararlas con el tratamiento control y entre sí (p -value $\geq 0,05$). Al contrario, las biomásas de las raíces de las plantas de trigo, no presentan diferencias significativas entre el control y cada uno de los tratamientos (Prosser et al., 2014a).

5.3.2. Determinación de la concentración de triclocarbán en los cultivos de plantas de trigo en los sistemas suelo-biosólido.

En la Figura 20, se observan las concentraciones de TCC del suelo TQ. En las raíces del sistema TQ-BLA, las concentraciones aumentaron ligeramente desde $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la dosis 30 Mg ha^{-1} hasta $55 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la dosis 200 Mg ha^{-1} y triclocarbán no fue detectado en la parte aérea de este sistema.

Para el sistema TQ-BLA-E, se observa que al incrementar la dosis de biosólido aumenta la concentración de TCC en las raíces (concentraciones entre 89 y $227 \mu\text{g kg}^{-1}$). Para la parte aérea de este sistema, no existe un comportamiento

definido, ya que en la dosis intermedias de 60 y 90 Mg ha⁻¹, presentan concentraciones de 25 µg kg⁻¹ que son menores a las que presentan las dosis 30 y 200 Mg ha⁻¹ (30 y 55 µg kg⁻¹, respectivamente).

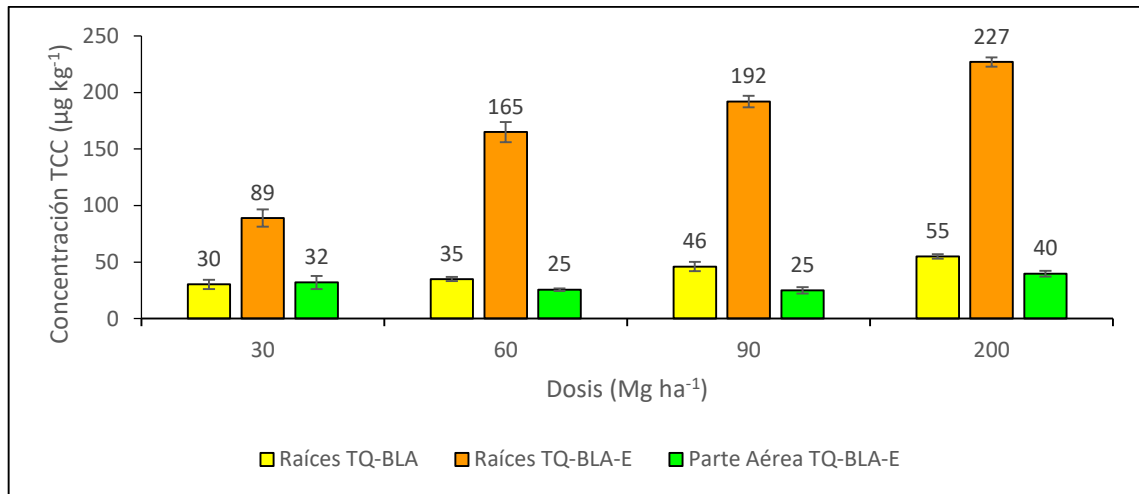


Figura 20: Concentración de TCC en los sistemas de suelo TQ.

Las concentraciones de TCC para el suelo CL se observan en la Figura 21. Para el sistema CL-BLA la concentración de TCC en las raíces, entre 27 y 53 µg kg⁻¹, no presenta una tendencia definida al aumentar la dosis de biosólido, sin embargo, existen diferencias significativas entre la dosis 30 y la 200 Mg ha⁻¹. Triclocarbán no fue detectado en la parte aérea de este sistema.

En las raíces de las plantas cultivadas en el sistema CL-BLA-E, se observa que al aumentar la dosis de biosólido también aumenta la concentración de TCC, que variaron entre 87 y 390 µg kg⁻¹. En la parte aérea, la concentración de TCC presentó un rango entre 24 y 28 µg kg⁻¹, que es un comportamiento constante al aumentar la dosis de biosólido.

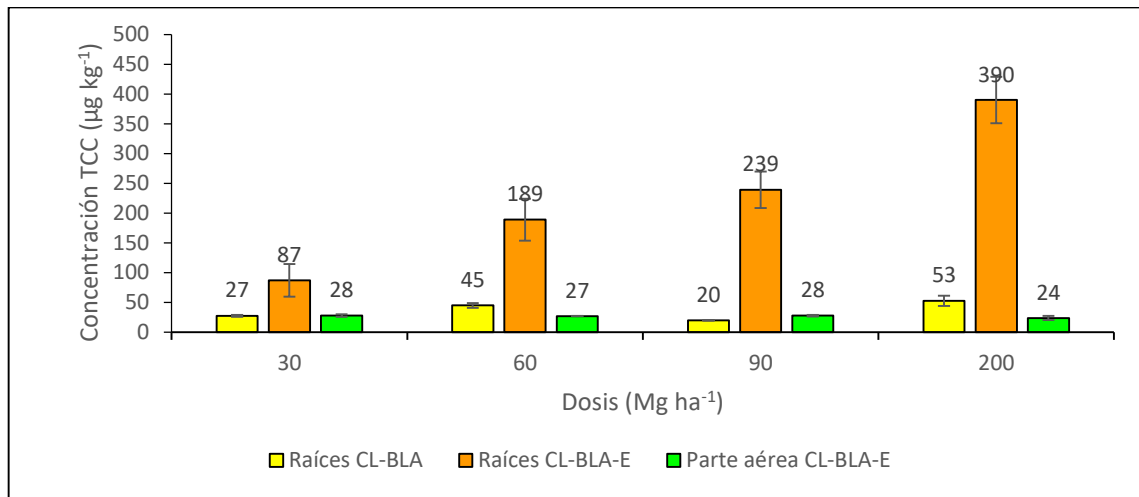


Figura 21: Concentración de TCC en los sistemas de suelo CL.

En la Figura 22, se observan las concentraciones de TCC en el sistema GE-BCH. Para las raíces, las concentraciones de TCC aumentaron desde 135 a 555 $\mu\text{g kg}^{-1}$, al incrementar las dosis, lo mismo ocurre para la parte aérea, en un rango más acotado de concentraciones, entre 6 y 44 $\mu\text{g kg}^{-1}$, exceptuando la dosis de 60 Mg ha^{-1} , que no sigue esta tendencia.

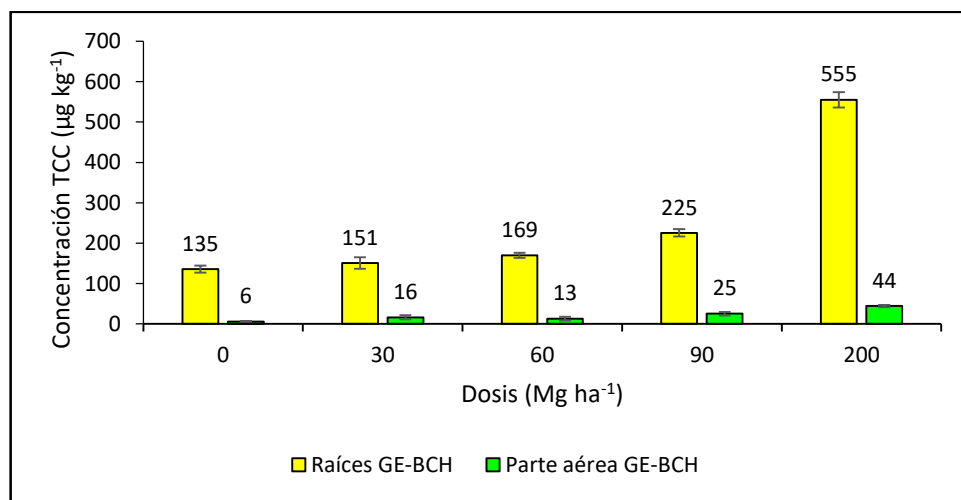


Figura 22: Concentración de TCC en los sistemas de suelo GE.

Para el sistema GU-BGU, las concentraciones de TCC determinadas en las raíces se observan en la Figura 23. Al incrementar el enriquecimiento del biosólido (tratamiento B-1 al B6), también aumenta la concentración de TCC en las raíces, con excepción del tratamiento 4. El rango de concentraciones va desde 440 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el tratamiento B-1 hasta 6295 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en el tratamiento B-6.

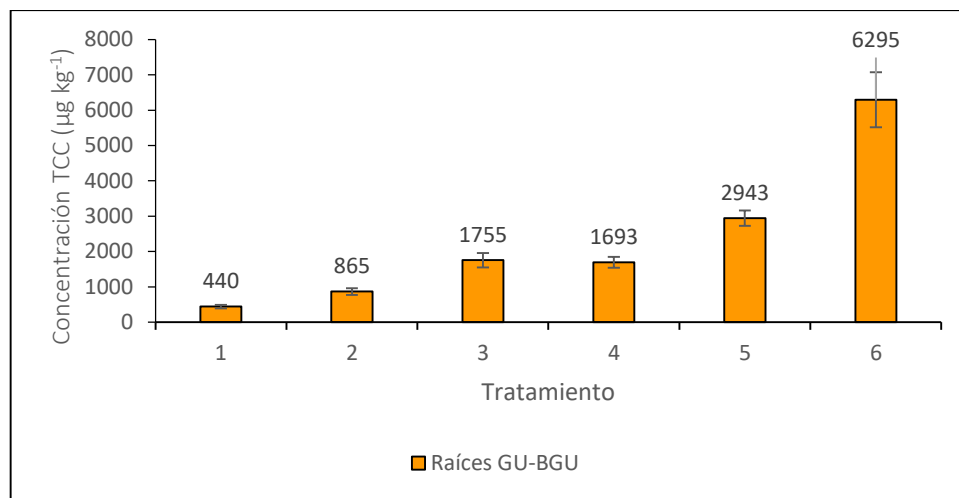


Figura 23: Concentración de TCC en el sistema GU-BGU.

Las concentraciones de triclocarbán en el tejido vegetal de plantas cultivadas en suelos tratados con biosólidos, en general, varían desde el rango de las partes por billón a las partes por millón. En las raíces, partes aéreas y frutos de pimientos, coliflor, lechuga, rábano y tomate, las concentraciones de TCC varían desde 90 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Wu et al., 2012). En cambio, para las raíces, tallos y hojas de calabazas, zapallos italianos y pasto varilla, las concentraciones de triclocarbán varían entre 3 y 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Aryal and Reinhold, 2011).

En el presente estudio, las concentraciones de triclocarbán en las plantas de trigo cultivadas en diferentes sistemas suelo-biosólido en distintas dosis, suelo-biosólido enriquecido con TCC en distintas dosis y suelo-biosólido enriquecido con concentraciones crecientes de TCC en una dosis, se encuentran dentro de los rangos anteriormente reportados por distintos investigadores.

5.3.3. Factor de translocación de triclocarbán.

Se calculó el factor de translocación (FT), que relaciona las concentraciones en la raíz con las de la parte aérea (Briggs et al., 1982; Paterson et al., 1990; Prosser et al., 2014b), según la ecuación 1. En este estudio, se calcula el FT para los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH, ya que se cuenta con ambas concentraciones.

$$FT = \frac{C_{parte\ aérea}}{C_{raíz}} \quad (1)$$

En la Figura 24, se observa que los valores de los FT de TCC son menores a uno, indicando que TCC permanece principalmente en la raíz de las plantas. Además, los FT son mayores para los suelos tratados con BLA-E. Tanto las plantas de los sistemas TQ-BLA-E y GE-BCH no presentaron una tendencia clara en el FT al incrementar la dosis de biosólido. Para el sistema CL-BLA-E, se observa que el FT decrece, al aumentar la dosis de biosólido. Al observar los resultados de los FT, se observa que los mayores valores, se encuentran en las dosis de 30 Mg ha⁻¹.

Al realizar los análisis ANOVA correspondientes, se encuentra que los FT presentan diferencias significativas entre ellos al aumentar la dosis de biosólido, con *p*-values de 0,0298 y 0,0132 para los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E, respectivamente. El análisis Tukey del suelo TQ, presenta tres grupos homogéneos de distribución, donde la dosis de 30 Mg ha⁻¹, es la que entrega la diferencia significativa. Para el suelo CL, presenta dos grupos homogéneos, donde nuevamente la dosis de 30 Mg ha⁻¹, es la que es diferentemente significativa.

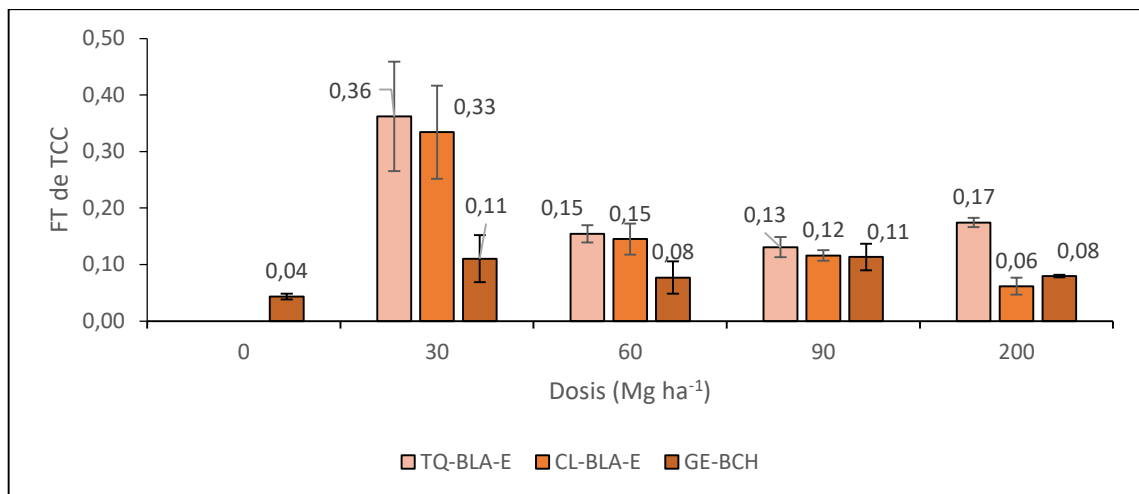


Figura 24: FT de TCC de los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH.

La mayor ruta de absorción de los compuestos orgánicos se produce a través el equilibrio de partición que ocurre entre lípidos contenidos en los tejidos de las raíces, como resultado de la hidrofobicidad de las moléculas (Gottschall et al., 2012). Como consecuencia, poseen una menor tendencia a la translocación, lo

que se explica por la retención de estos compuestos en la endodermis del cilindro central de las raíces de las plantas (Aryal and Reinhold, 2011; Briggs et al., 1982).

Se observa en la Tabla 18, que los FT se encuentran dentro de los rangos anteriormente reportados, pero al no encontrar resultados para plantas de trigo, éstos no son comparables. Además, se debe considerar que en los estudios se utilizan diferentes dosis de biosólido, por lo tanto, distintas concentraciones de triclocarbán y tipos de suelo y de los tiempos de cultivo (30 y 65 días).

Tabla 18: Comparación de factores de translocación de triclocarbán.

Planta	FT	Comentario	Dosis (Mg ha ⁻¹)	Referencia
Poroto de soya	0,06 ± 0,02	Día 60	12	Wu et al., 2010
	0,22 ± 0,07	Día 110		
Calabaza	0,78 ± 0,55	-	7,3	Aryal y Reinhold, 2011
Zapallos italianos	0,27 ± 0,19	-		
Pasto varilla	0,52	-		
Trigo	0,11 ± 0,04	Día 30	30	Este trabajo
	0,08 ± 0,03		60	
	0,11 ± 0,02		90	
	0,080 ± 0,002		200	

5.4. Desarrollo de métodos biosimuladores de triclocarbán.

5.4.1. Optimización de una metodología con HP- β -CD.

Las etapas que fueron optimizadas fueron el disolvente utilizado en la extracción líquido-líquido con la solución acuosa de la ciclodextrina y el tiempo necesario para obtener el equilibrio de extracción entre los suelos tratados con biosólido y la disolución acuosa de HP- β -CD.

5.4.1.1. Estudio del solvente de extracción.

Los disolventes hexano y diclorometano, forman emulsiones con la solución de HP- β -CD y metanol. Al utilizar acetato de etilo como disolvente de extracción, se forma una sola fase, por lo que no es el adecuado para realizar la extracción líquido-líquido. Al realizar las extracciones con las mezclas acetato de etilo-hexano y acetato de etilo-diclorometano, la formación de emulsión se minimiza, por lo que las recuperaciones en las extracciones mejoran considerablemente. La mezcla de diclorometano y acetato de etilo 1:1, presentó la mayor recuperación de TCC (Tabla 19) y una baja desviación estándar, por lo que fue seleccionada para la extracción líquido-líquido.

Tabla 19: Recuperación de TCC para el disolvente de extracción de HP- β -CD.

Disolvente	Concentración TCC (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)
Diclorometano-acetato de etilo 1:1	1,92 ± 0,02	96 ± 1
Diclorometano	0,18 ± 0,01	9 ± 5
Hexano	0,3 ± 0,1	15 ± 33
Hexano-acetato de etilo 1:1	1,7 ± 0,3	85 ± 17
Acetato de etilo	n.d	n.d

n.d: no determinado

5.4.1.2. Estudio del tiempo de equilibrio.

En la Figura 25, se puede observar que el equilibrio de extracción con HP- β -CD fue alcanzado aproximadamente a los 40 min, para un suelo tratado con biosólido enriquecido con TCC en una dosis de 90 Mg ha⁻¹. Para evitar dispersiones o mayores desviaciones que se presentan antes de los 60 min y a partir de los 240 min, por lo tanto, 60 min fue seleccionado como el tiempo de extracción de TCC.

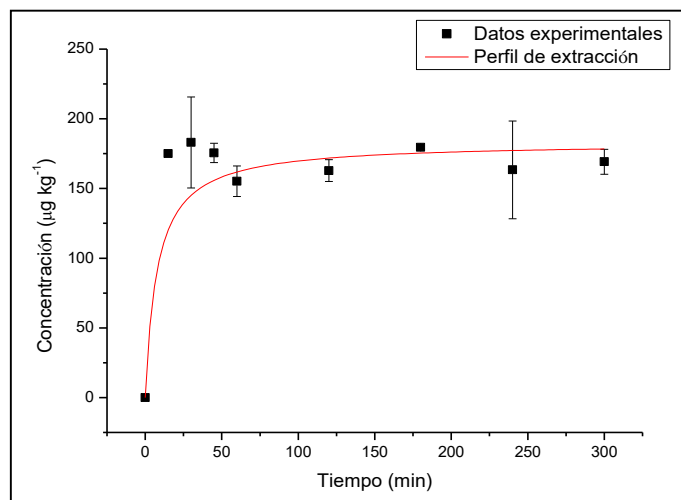


Figura 25: Perfil del tiempo de extracción de TCC con HP- β -CD.

5.4.2. Optimización de la extracción con disco rotatorio de triclocarbán desde extractos acuosos.

5.4.2.1. Estudio de variables de la etapa de extracción.

Se utilizó un diseño factorial de tres niveles (3^2) de 12 experimentos considerando tres centros (Tabla 20), lo que significa que se realizaron tres experimentos con los niveles centrales ó tabulados como 0 considerados en la Tabla 3. Al considerar dos modificadores de matriz, como el cloruro de sodio para el efecto *salting out*, que cambia la fuerza iónica del medio de extracción y metanol, utilizado para compuestos con $\log K_{ow} > 5$, en la prevención de la adsorción de los compuestos en las paredes de los viales (Jachero et al., 2013; Prieto et al., 2010). En investigaciones previas, se observó que un menor volumen de muestra disminuyó el tiempo de extracción, pero el factor de preconcentración disminuyó concomitantemente (Jachero et al., 2013). Por lo tanto, el factor de preconcentración fue fijado en 50, por lo que se consideró un volumen de muestra de 25 mL para todos los experimentos.

Tabla 20: Resultado de diseño de experimento de la extracción.

Experimento	MeOH (%)	NaCl (%)	Recuperación TCC (%)
1	10	10	41,5
2	10	10	38,5
3	10	10	38,2
4	20	10	25,8
5	10	20	32,2
6	20	20	26,6
7	0	20	59,8
8	10	10	38,9
9	0	0	46,0
10	0	10	51,8
11	20	0	32,3
12	10	0	32,0

El análisis del diseño del experimento de la tabla 20, indicó que se explica un 93% (R^2) de la varianza de la respuesta (porcentaje de recuperación). El ANOVA desarrollado, indica que el rango de porcentaje de metanol estudiado (0, 10 y 20%) posee un efecto negativo y significativo (p -value= 0,0002) en la extracción de triclocarbán, lo que se puede observar en la carta pareto en la Figura 26. Además, indica que la presencia de cloruro de sodio en la muestra presenta un efecto positivo pero no significativo (p -value= 0,3741). Por lo tanto, la extracción de triclocarbán se desarrollará sin el uso de modificadores de matriz.

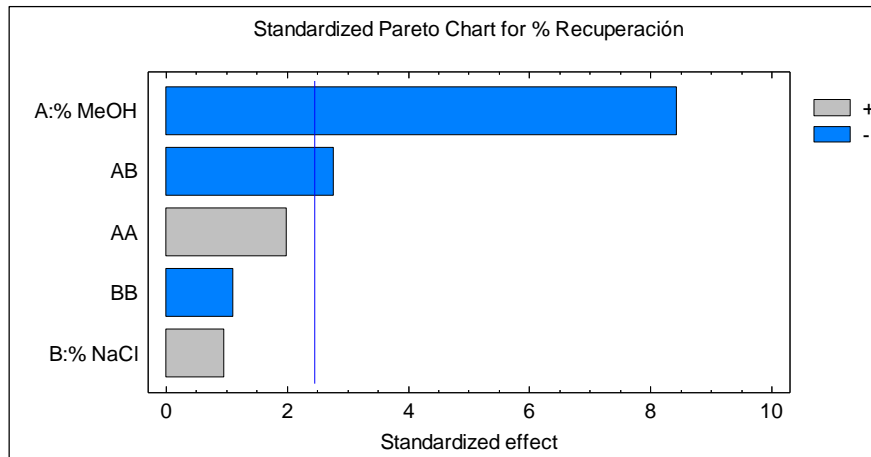


Figura 26: Carta Pareto estandarizada para la recuperación de la extracción de triclocarbán.

5.4.2.2. Estudio de variables de la desorción.

Se utilizó un diseño factorial de tres niveles (3^2) de 12 experimentos (Tabla 21), con el cual se estudió el tiempo de desorción y el volumen de metanol utilizado para desorber el triclocarbán desde la fase de PDMS, con tres centros, lo que significa que se realizan tres experimentos considerando los niveles centrales (0) de la Tabla 4.

Tabla 21: Resultado de diseño de experimentos de la desorción.

Experimento	MeOH (mL)	Tiempo (min)	Recuperación TCC (%)
1	10	30	48,2
2	10	30	53,6
3	10	30	57,7
4	15	30	49,5
5	15	15	34,3
6	5	45	49,7
7	15	45	38,9
8	5	30	51,7
9	10	15	55,0
10	5	15	39,5
11	10	30	52,4
12	10	45	53,7

En la Figura 27, que corresponde a la carta Pareto del análisis del diseño del experimento, indica que se explica un 71% (R^2) de la varianza del porcentaje de recuperación. El ANOVA desarrollado, indica que el volumen de metanol, en el intervalo estudiado, presenta un efecto negativo y no significativo (p -value: 0,2105); y que el tiempo de desorción presenta un efecto positivo y no significativo (p -value: 0,3385).

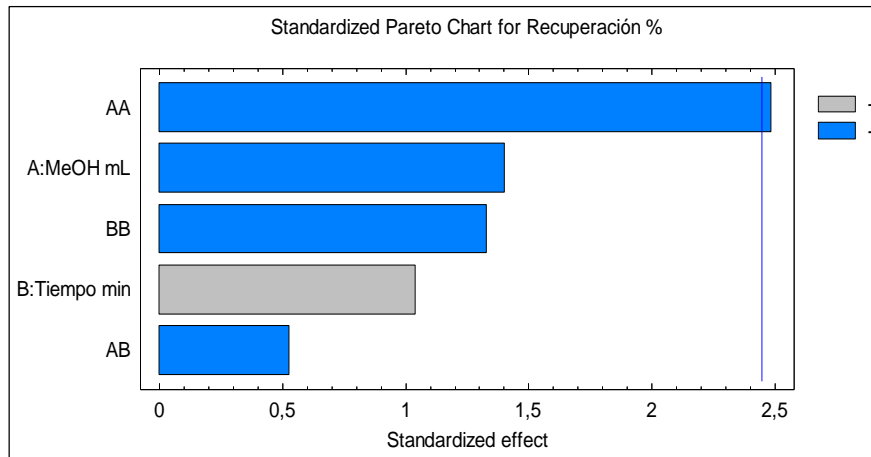


Figura 27: Carta Pareto estandarizada para la recuperación de la desorción de triclocarbán.

Al observar la superficie de respuesta del proceso de desorción (Figura 28), se puede observar que las mayores recuperaciones se obtienen en los niveles centrales (nivel 0, en las variables codificadas). Por lo tanto, se utilizan 10 mL de metanol como volumen de desorción y 30 min como tiempo de desorción.

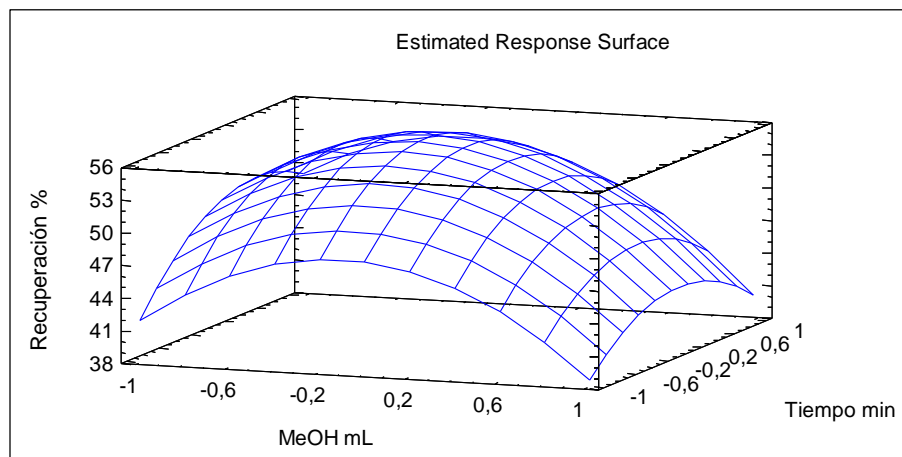


Figura 28: Superficie de respuesta estimada para la desorción de triclocarbán.

5.4.2.3. Número de etapas de desorción.

Al realizar el estudio del número de etapas de desorción de TCC, se obtiene que para una etapa de desorción con 10 mL de metanol y 30 min, las recuperaciones son $57 \pm 3\%$ y para las dos etapas (5 mL de metanol y de 15 min, cada una), de $59 \pm 2\%$. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), que indica que no existen diferencias significativas entre el número de etapas de desorción y la recuperación de triclocarbán (p -value= 0,5755), además forman un grupo homogéneo. Para evitar manipulación innecesaria de la muestra, se utilizó una etapa de desorción para la metodología.

5.4.2.4. Optimización de variables generales.

La velocidad de rotación del disco fue estudiada entre 200 y 2000 rpm. En la Figura 29, se observa que al aumentar la velocidad, la recuperación de triclocarbán se incrementó. Por lo tanto, se seleccionó la velocidad de rotación del disco de 2000 rpm.

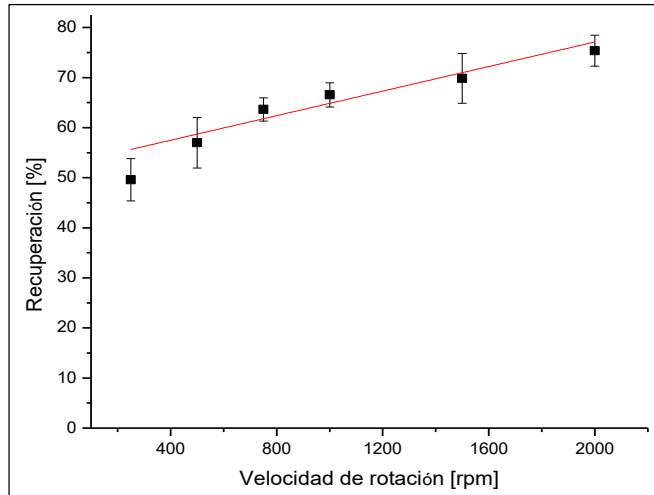


Figura 29: Efecto de la velocidad de rotación del disco en la extracción de triclocarbán.

Esto se debe a que al aumentar la velocidad de rotación, la capa límite de la extracción disminuye su tamaño, por lo tanto, la difusión del analito y la transferencia de masa es más rápida, alcanzando así menores tiempos de equilibrio (Figura 30) (Barry, 1998; Chiu et al., 2011; Richter et al., 2009).

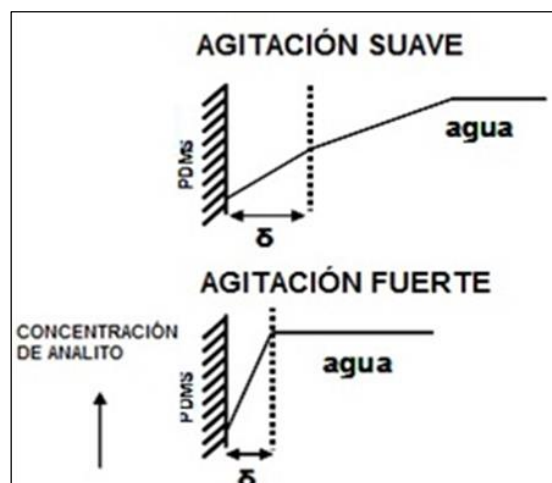


Figura 30: Diagrama de la capa límite de la extracción.

En el estudio del pH de la extracción, se consideró un rango entre 1 y 12. Como se observa en la Figura 31, la eficiencia de extracción es independiente del pH hasta pH 8 y luego las recuperaciones comienzan a decaer. Esto se debe que a pH 10, se encuentra dos unidades de pH bajo el pK_a 12,7 de triclocarbán; por lo tanto, comienza la deprotonación del compuesto (Figura 32). El valor de pH seleccionado para realizar las extracciones fue pH 5.

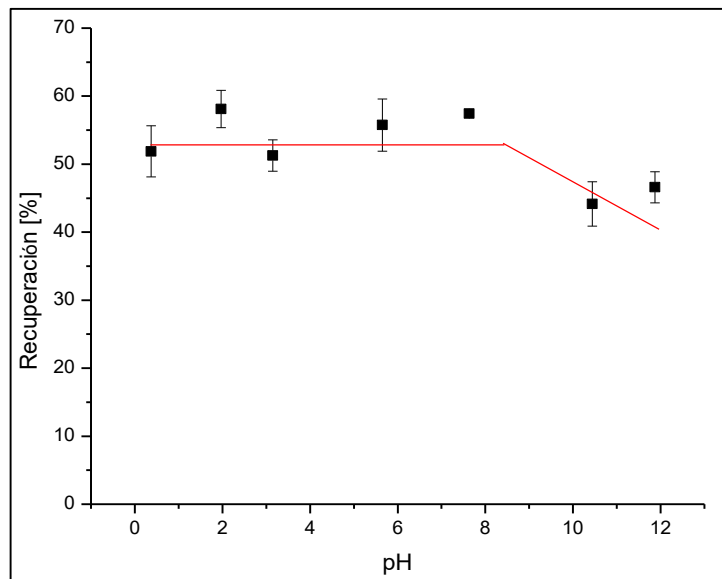


Figura 31: Efecto pH en la extracción de triclocarbán.

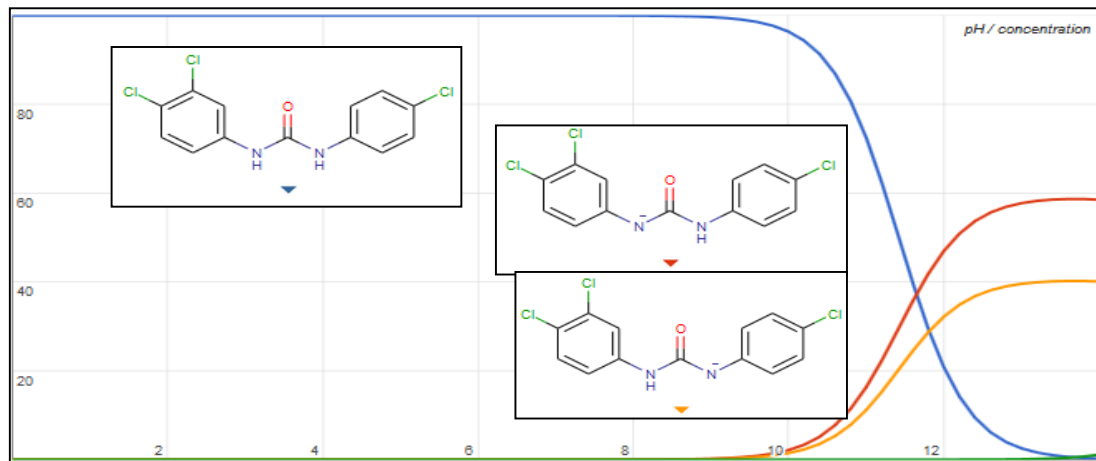


Figura 32: Diagrama de triclocarbán y pH (Chemicalize, 2015b).

El efecto del pH en las recuperaciones de triclocarbán no es atribuible a los cambios que pueden ocurrir en la micro-textura de la fase sorbente de PDMS utilizada en la extracción. Cambios en la micro-textura han sido reportados al sumergir la fase de PDMS en disoluciones (porcentaje en peso) de hidróxido de potasio (86,9%), ácido fluorhídrico (49%), ácido nítrico (69,8%) y ácido sulfúrico (96%) con exposiciones de 1620 min (Mata and Fleischman, 2005). Debido a que en las extracciones realizadas sólo se utiliza agua y metanol, no se esperan cambios en la fase de PDMS.

En la Figura 33, se observa el efecto del volumen de muestra, donde el equilibrio es alcanzado en una hora para la muestra de 25 mL, mientras que el equilibrio no es alcanzado para la muestra de 50 mL, considerando como equilibrio de extracción recuperaciones de triclocarbán del 60%.

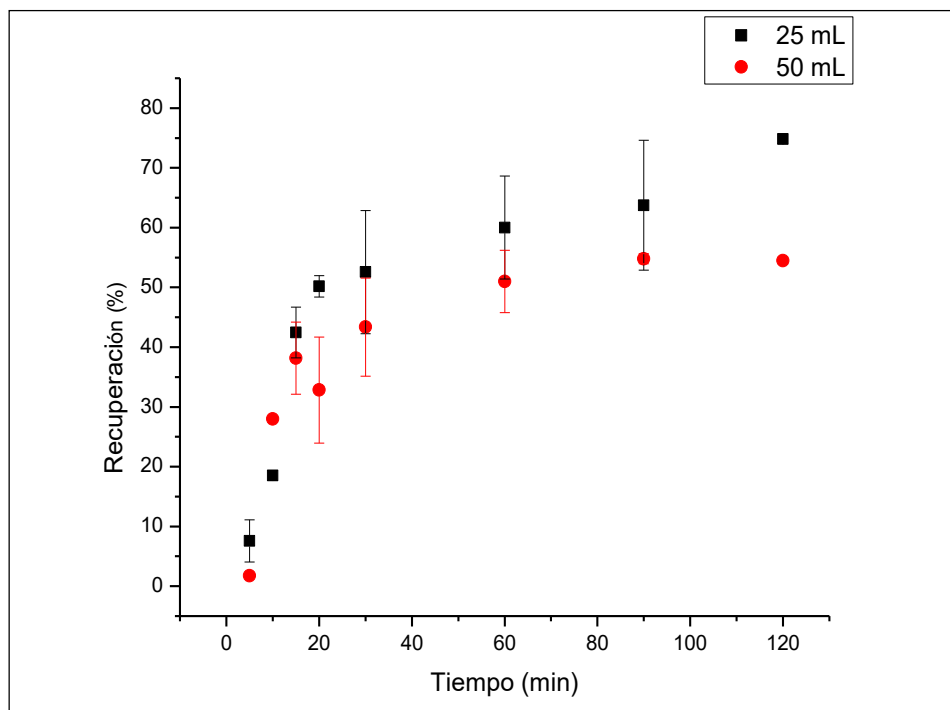


Figura 33: Efecto del volumen de muestra en el tiempo de extracción de TCC.

Como resumen, la extracción por disco rotatorio de triclocarbán, se realizó como sigue: volúmenes de muestra de 25 mL, velocidad de agitación de 2000 rpm y una hora para la extracción y una etapa de desorción con 10 mL de metanol durante 30 min.

5.4.2.5. Ensayos de recuperación de TCC.

Se realizó el estudio de recuperación en agua potable de triclocarbán en distintos niveles de concentración (entre 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). En la Tabla 22, se observan las recuperaciones de triclocarbán cercanas al 60% y coeficientes de variación entre 2 y 4%. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para la metodología fueron de 63 y 209 ng L^{-1} , respectivamente.

Tabla 22: Ensayos de recuperación de triclocarbán en agua potable.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	CV (%)
1	63 ± 1	2
2,5	64 ± 2	4
5	54 ± 2	4
10	59 ± 2	3

5.5. Aplicación de los métodos simuladores de TCC a los suelos tratados con biosólido.

5.5.1. Tratamiento con HP- β -CD.

En la Figura 34, se presentan las concentraciones de TCC extraídas desde los sistemas TQ-BLA y CL-BLA. Se observa que las concentraciones, son similares para ambos sistemas, con la excepción de la dosis 200 Mg ha^{-1} . El sistema suelo-biosólido TQ-BLA presentó una tendencia creciente en la concentración de TCC al incrementar la dosis del biosólido y para CL-BLA las concentraciones de TCC no presentaron una tendencia definida al aumentar la dosis de biosólido, considerando las desviaciones estándar.

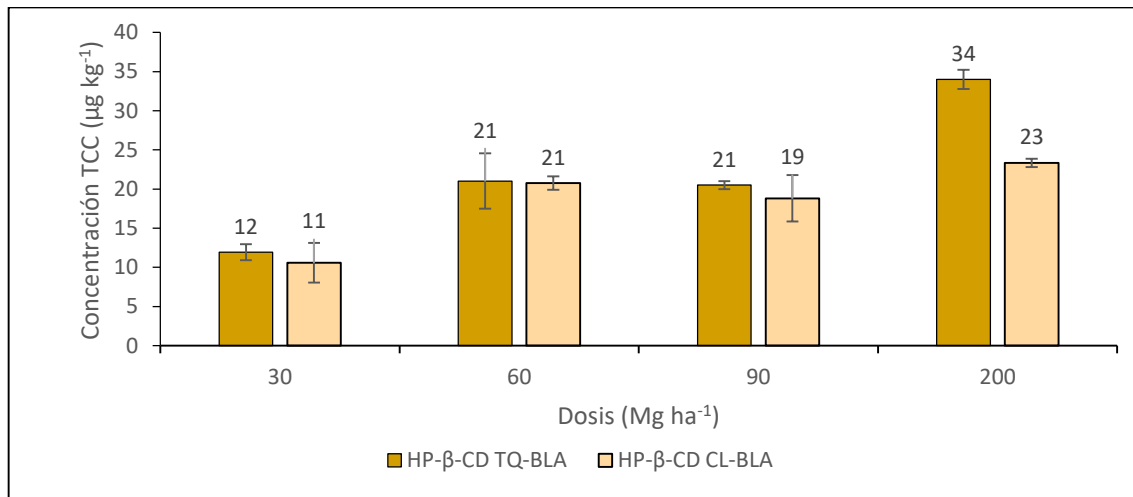


Figura 34: Extracción de TCC con HP-β-CD de los sistemas tratados con BLA.

Para los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH que se presentan en la Figura 35, se observa que al aumentar la dosis de biosólido, también aumentó la concentración de TCC con HP-β-CD.

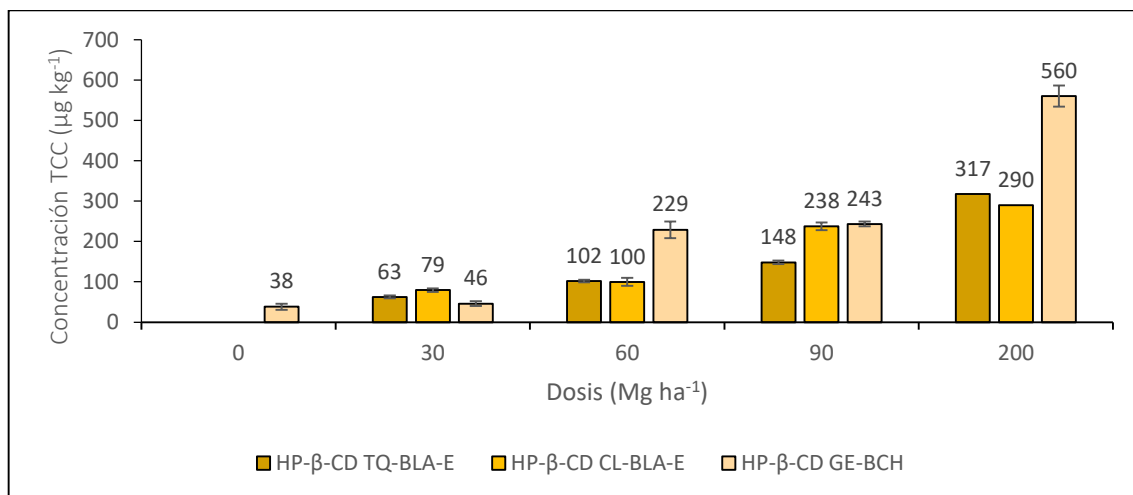


Figura 35: Extracción de TCC con HP-β-CD de los sistemas tratados con BLA-E y BCH.

En el sistema GU-BGU, se observa un aumento de la extracción de TCC con HP- β -CD al aumentar el enriquecimiento del biosólido para cada tratamiento en cada tratamiento, a excepción del tratamiento B3 (Figura 36).

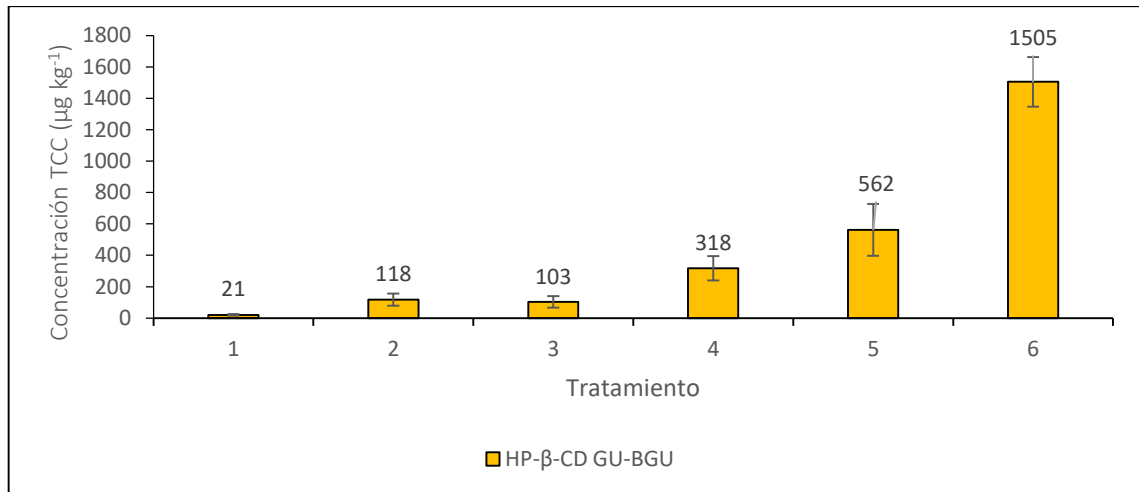


Figura 36: Extracción de TCC con HP- β -CD del sistema tratado con BGU.

5.5.2. Tratamiento con solución acuosa/RDSE.

5.5.2.1. Modo de rotación horizontal (EA/RDSE_h).

Para el sistema GE-BCH, que se presenta en la Figura 37, no se observa una tendencia entre la concentración de triclocarbán y el incremento de la dosis de biosólido. Cabe destacar que, para la dosis de 0 Mg ha⁻¹ (muestra que sólo posee suelo), se obtiene la mayor lixiviación, lo que significa que al agregar la materia orgánica del biosólido la disponibilidad de triclocarbán disminuye.

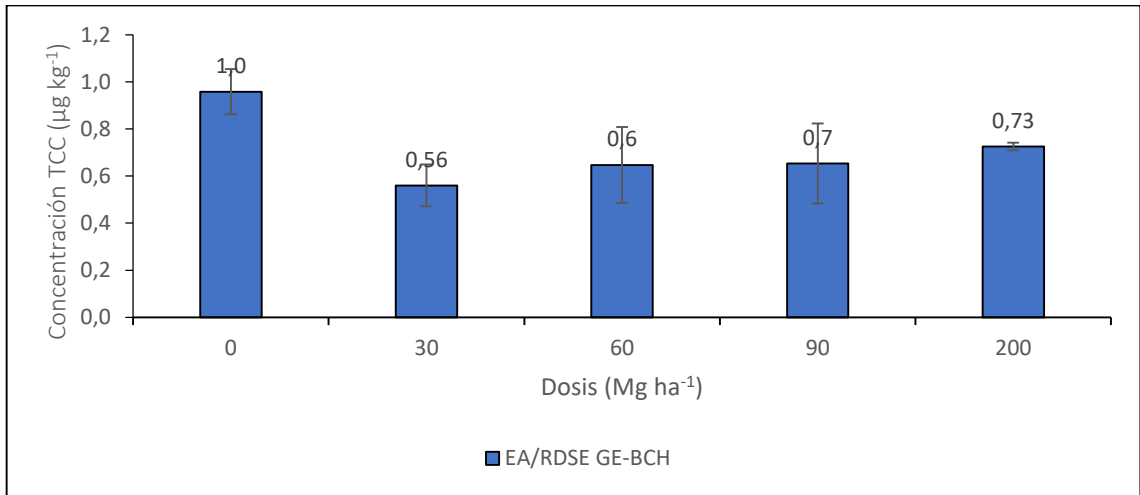


Figura 37: Extracción de TCC con EA/RDSE_h del sistema GE-BCH.

En la Figura 38, se presenta la fracción extractable de TCC con EA/RDSE para el sistema GU-BGU. Al aumentar el enriquecimiento del biosólido con TCC desde 35 a 3133 µg kg⁻¹ entre los tratamientos 1 y 6, las concentraciones lixiviadas se incrementan desde el tratamiento 2 al 6.

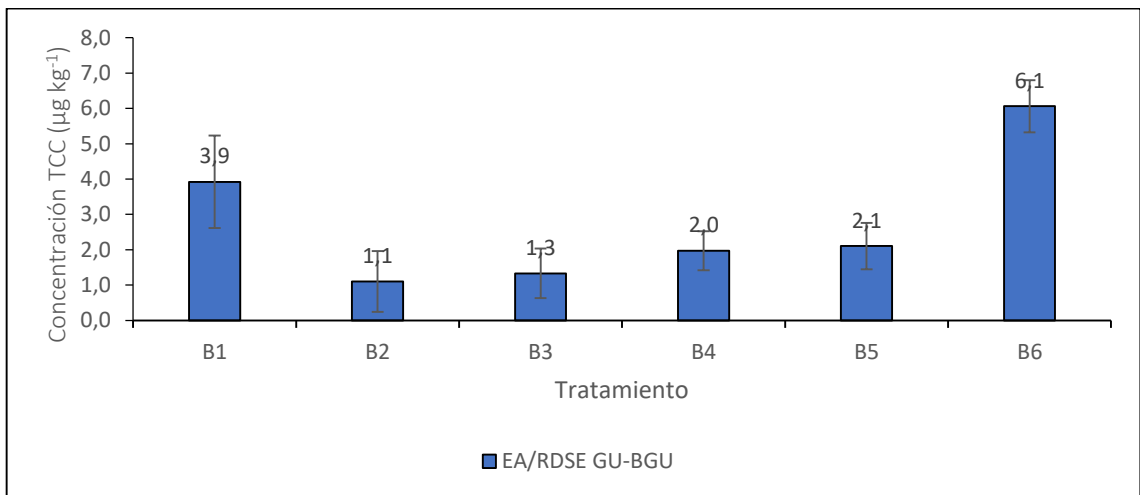


Figura 38: Extracción de TCC con EA/RDSE_h del sistema GU-BGU.

Al comparar los sistemas GE-BCH (Figura 37) y GU-BGU (Figura 38), que fueron extraídos con el modo horizontal de rotación del disco rotatorio, la fracción lixiviable para este último sistema, es mayor (entre 1,1 y 6,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$). El sistema estudiado con suelo GE fue tratado con biosólido que contiene TCC “naturalmente”, o sea, ha sido acumulado durante el tratamiento de aguas servidas y ha sido equilibrado entre el efluente y el lodo producido. Por otro lado, el sistema con suelo GU fue tratado con biosólido enriquecido con TCC en distintas concentraciones, aunque haya sido equilibrado previamente, es mucho más lábil, ya que no se encuentra profundamente ocluido en la materia orgánica del biosólido.

5.5.2.2. Modo de rotación vertical (EA/RDSEv).

La extracción acuosa integrada a la extracción con disco rotatorio en modo de rotación vertical, fue aplicada a todos los sistemas tratados tanto con BLA y BLA-E. Para los sistemas TQ-BLA y CL-BLA, TCC no fue detectado luego de aplicar esta técnica de extracción. Para los suelos tratados con BLA-E, al aumentar la dosis de biosólido, se observa una tendencia constante en la concentración lixiviada de TCC para el sistema con suelo TQ; y para el sistema con suelo CL, las concentraciones de TCC se incrementan (a excepción de la dosis 90 Mg ha^{-1}), como se observa en la Figura 39.

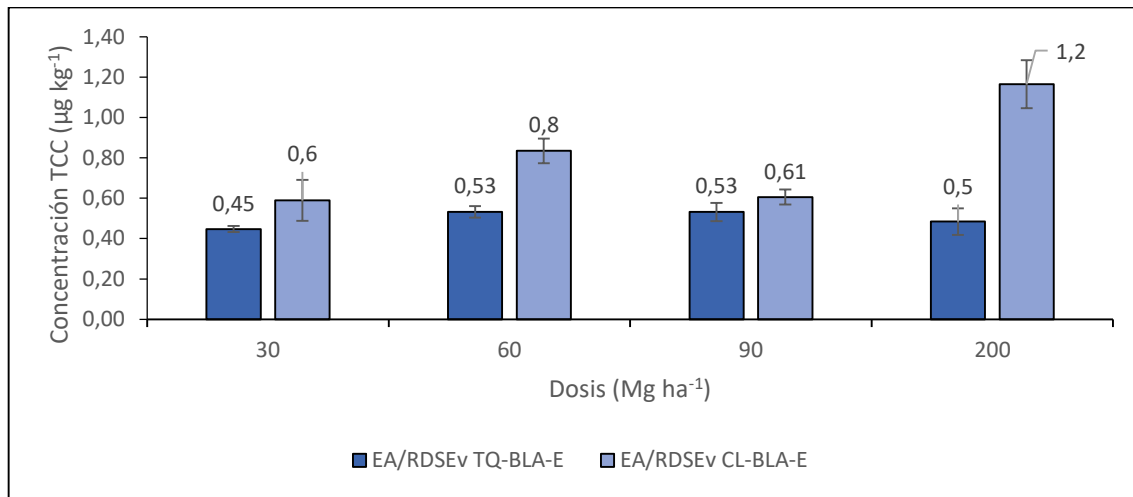


Figura 39: Extracción de TCC con EA/RDSE_v.

Para la extracción acuosa y la extracción con disco rotatorio, en sus dos configuraciones de rotación: horizontal y vertical, se observan que las concentraciones de TCC obtenidas no superan los 6 µg kg⁻¹, para todos los sistemas estudiados (Figuras 36, 37 y 38). Esto es esperable, ya que la solubilidad del triclocarbán es de 45 µg L⁻¹ y es un compuesto hidrofóbico con un log K_{ow} de 3,5, por lo tanto, la partición entre el suelo tratado con biosólido y el solvente de extracción (0,001 M de CaCl₂) no será favorable. En un estudio de suelos tratados con distintos biosólidos, se demostró que la movilidad de triclocarbán es mínima, ya que tiende a unirse al componente que presenta un mayor porcentaje de carbono orgánico (Agyin-Birikorang et al., 2010).

5.6. Factores de concentración de triclocarbán (FBC).

Con los resultados obtenidos para las concentraciones de TCC en cada una de las matrices estudiadas se realizaron correlaciones simples con las

concentraciones de TCC determinadas en cada uno de los suelos, para obtener los factores de bioconcentración (FBC) y concentración (FC) que corresponde a la pendiente de la curva de cada regresión. Este método de cálculo es realizado para que el resultado sea independiente tanto de la dosis de biosólido y de la materia orgánica aplicada como tratamiento (O'Connor, 1996).

Se define el factor de bioconcentración (FBC) para los tejidos vegetales, tanto raíces como parte aérea y el factor de concentración (FC) para los métodos biosimuladores (extracción con HP- β -CD y EA/RDSE).

5.6.1 Factores de bioconcentración (FBC) plantas de trigo.

En la Tabla 23, se muestran los FBC de triclocarbán para las raíces de las plantas de trigo (FBC-R). En los seis sistemas estudiados, se observan coeficientes de correlación entre 0,6380 y 0,9724 y porcentajes de explicación del comportamiento de TCC entre 40 y 95%, de ellos cinco presentan relaciones estadísticamente significativas, además, de FBC menores a 1 ($FBC < 1$), indicando que las raíces no bioacumulan triclocarbán en el tiempo implícito en el experimento.

En el sistema GU-BGU, que fue tratado con biosólido enriquecido con triclocarbán, las raíces bioacumularon TCC. El suelo GU presenta un tamaño de partícula mediano y un bajo porcentaje de carbono orgánico (CO: 1,8%), por lo que no retiene de manera eficiente el TCC agregado como parte del

enriquecimiento. Para el sistema CL-BLA, existe una relación no significativa entre la concentración de TCC presente en las raíces y con la del suelo (p -value $>0,05$). Además, el coeficiente de correlación es menor a 0,75 ($R <0,75$). Esto se explica porque el suelo CL, posee una menor presencia de partículas más finas (que son más activas), además del menor porcentaje de carbono orgánico entre los suelos estudiados (CO: 1,6%) (Agyin-Birikorang et al., 2010). Los gráficos utilizados en el FBC-R, se encuentran en el anexo 4.

Tabla 23: FBC-R de TCC.

Sistema	p-value	R	R² (%)	FBC-R
TQ-BLA	0,0003*	0,9524	90,70	0,56 ± 0,06
CL-BLA	0,1231	0,6380	40,71	0,5 ± 0,3
TQ-BLA-E	0,0023*	0,9008	81,14	0,19 ± 0,04
CL-BLA-E	0,0001*	0,9724	94,56	0,47 ± 0,05
GE-BCH	0,0000*	0,9302	86,53	0,14 ± 0,02
GU-BGU	0,0000*	0,9607	92,30	1,7 ± 0,1

*: estadísticamente significativo

En general, los FBC-R de las plantas de trigo en los suelos TQ, CL y GE, fueron menores en los suelos tratados con biosólido enriquecido con triclocarbán, que en los suelos tratados con biosólido que poseen triclocarbán “nativo”. Esto indica que las plantas pueden tener una capacidad de absorción del compuesto limitada, impidiendo la translocación del contaminante a otras partes de la planta (Corrotea et al., 2016). Los compuestos lipofílicos presentan un transporte limitado a través de la endodermis desde la solución de suelo (Pannu et al., 2012;

Wu et al., 2013). Las vías de la absorción de compuestos químicos por las plantas, dependen de las propiedades químicas, condiciones ambientales y las características de la especie (Pannu et al., 2012).

En la Tabla 24, se observan los factores de bioconcentración de TCC de la parte aérea de las plantas cultivadas en los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH. Estos valores se encontraron entre 10 y 100 veces menores que los encontrados en las raíces. Las tres correlaciones realizadas son significativas en un nivel del 95%, presentan coeficientes de correlación mayores a 0,7 y porcentajes de explicación del comportamiento entre 50 y 88%. Cabe destacar que para el sistema CL-BLA-E existe una relación directa y negativa entre las concentraciones de triclocarbán en la parte aérea y el suelo, es decir, que al aumentar la concentración de triclocarbán en el suelo, en la parte aérea, disminuye. Los gráficos utilizados se encuentran en el anexo 5.

Tabla 24: FBC-PA de TCC.

Sistema	p-value	R	R² (%)	FBC-PA
TQ-BLA- E	0,0157*	0,8487	72,02	0,024 ± 0,007
CL-BLA-E	0,0424*	-0,7236	52,36	0,007 ± 0,003
GE-BCH	0,0000*	0,9377	87,92	0,012 ± 0,001

*: estadísticamente significativo

Los factores de bioacumulación de raíces (FBC-R) y parte aérea (FBC-PA) han sido ampliamente reportados en la literatura (Tabla 25), pero no existen estudios en plantas de trigo.

Tabla 25: FBC para triclocarbán en distintos estudios.

Planta	FBC-R	FBC-PA	FBC	Comentario	Referencia
Pimiento	0,73 ± 0,24	0,73 ± 0,56	-	-	(Wu et al., 2012)
Col	0,67 ± 0,08	0,12 ± 0,11	-	-	
Lechuga	0,34 ± 0,26	0,25 ± 0,21	-	-	
Rábano	0,31 ± 0,10	0,36 ± 0,27	-	-	
Tomate	0,72 ± 0,10	0,48 ± 0,36	-	-	
Pimiento verde	-	-	0,11	2011	(Prosser et al., 2014b)
Zanahoria	-	-	0,10		
Pepino	-	-	0,12		
Tomate	-	-	0,11		
Zanahoria	-	-	< 0,11	2012	
Rábano	-	-	< 0,11		
Zanahoria	-	-	< 0,33	2013	
Rábano	-	-	< 0,33		
Lechuga	-	-	< 0,33		
Soya	1,7 ± 0,5	0,10 ± 0,03	-	60 días	
	2,0 ± 0,5	0,5 ± 0,1	-	110 días	
Calabaza	11,01 ± 5,06	-	-	-	(Aryal and Reinhold, 2011)
Zapallos italiano	40,27 ± 46,34	-	-	-	
Pasto varilla	30,92 ± 9,41	-	-	-	

En la Tabla 25, se observan los FBC-R y FBC-PA y FBC sin especificar de estudios desarrollados para obtener la biodisponibilidad de triclocarbán. Los valores de FBC-R presentados en este trabajo se encuentran dentro de los rangos, a excepción de los estudios realizados por Aryal y Reinhold, y en los FBC-PA, éstos son entre 5 y 100 veces menores a los reportados.

Debido a que los estudios para obtener los FBC-R y FBC-PA fueron realizados en distintas condiciones como contenido de carbono orgánico, textura y tipo de suelo, concentración de TCC y si su contenido es nativo o fue incorporado (enriquecido) al biosólido y las dosis de biosólidos aplicadas a los suelos, las especies vegetales y los tiempos de cultivo de ellas, el tipo de cultivo (columnas, maceteros, mesocosmos) y las condiciones ambientales (laboratorio, invernadero, en terreno agrícola); éstos no son comparables entre sí.

Los estudios de biodisponibilidad o sus efectos en la biomasa que los compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, son utilizados en para análisis de riesgo (risk assesment) tanto para los humanos, plantas, animales acuáticos y el medio ambiente (Snyder and O'Connor, 2013). En este estudio, se utilizan para generar un modelo predictivo o biosimulador.

5.6.2. Factores de concentración (FC): métodos simuladores.

En la Tabla 26, se observan que los valores de los factores de concentración de TCC con HP- β -CD (FC- HP- β -CD) en los distintos sistemas, son menores a 1 y varían entre 0,16 a 0,45. Los coeficientes de correlación varían entre 0,7 y 0,9, con porcentajes de explicación del comportamiento entre el 50 y el 98%. Las correlaciones son significativas a un nivel de confianza del 95%, a excepción del sistema CL-BLA. Los gráficos utilizados se encuentran en el anexo 6.

Tabla 26: FC-HP- β -CD de triclocarbán.

Suelo	<i>p</i> -value	R	R ² (%)	FA
TQ-BLA	0,0008*	0,9301	86,52	0,45 ± 0,07
CL-BLA	0,0731	0,7112	50,58	0,16 ± 0,07
TQ-BLA-E	0,0000*	0,9932	98,65	0,41 ± 0,02
CL-BLA-E	0,0018*	0,9089	82,61	0,35 ± 0,07
GE-BCH	0,0000*	0,9745	94,96	0,18 ± 0,01
GU-BGU	0,0000*	0,9592	92,02	0,44 ± 0,03

*: estadísticamente significativo

En la Tabla 27, se observan los valores obtenidos para las correlaciones realizadas entre EA/RDSE y la concentración de TCC en los suelos. Los factores de acumulación de TCC a través de esta técnica, indican que la fracción lixivable es muy pequeña, entre 10 y 1000 veces menor que el factor de bioconcentración encontrado tanto en las raíces, como en la parte aérea y de los factores de acumulación con ciclodextrina.

Las correlaciones estadísticamente significativas corresponden a los sistemas GU-BGU para el modo de rotación horizontal y CL-BLA-E para el modo de rotación vertical, siendo éstas las que presentan mayores coeficientes de correlaciones ($R > 0,75$) y un 70% de explicación del comportamiento. Los gráficos utilizados se encuentran en el anexo 7.

Tabla 27: FC-EA/RDSE de triclocarbán.

Extracción	Sistema	p-value	R	R ² (%)	FA
EA/RDSE _h	GE-BCH	0,0970	-0,5011	25,11	0,00027 ± 0,00009
	GU-BGU	0,0000*	0,8486	72,02	0,0013 ± 0,0002
EA/RDSE _v	TQ-BLA-E	0,1786	0,5731	32,84	0,00012 ± 0,00007
	CL-BLA-E	0,0099*	0,8352	69,75	0,0009 ± 0,0002

*: estadísticamente significativo.

No existen trabajos reportados hasta la fecha de métodos simuladores de triclocarbán aplicados a suelos tratados con biosólido para el estudio de los factores de concentración que ellos presentan.

5.7. Modelamiento de la fracción biodisponible de TCC con las fracciones obtenidas por los métodos biosimuladores.

Para validar los métodos de extracción estudiados con HP-β-CD y EA/RDSE, como simuladores de la fracción biodisponible de TCC, se realizaron correlaciones simples entre las concentraciones de TCC determinadas en las raíces y en la parte aérea con las obtenidas por los métodos simuladores.

5.7.1. Modelamiento con HP- β -CD.

Para la simulación con ciclodextrina, se consideró que las concentraciones de triclocarbán en las raíces estaban en rangos diferentes, sobre todo para el sistema GU-BGU, por lo que se realizaron dos correlaciones independientes.

En la Figura 40, se observa el modelamiento por correlación simple de las concentraciones de triclocarbán en las raíces de los sistemas TQ-BLA, TQ-BLA-E, CL-BLA, CL-BLA-E y GE-BCH (distintas dosis de biosólido) y las concentraciones correspondientes a los suelos con HP- β -CD. Se puede desprender que existe una relación directa y positiva entre las concentraciones.

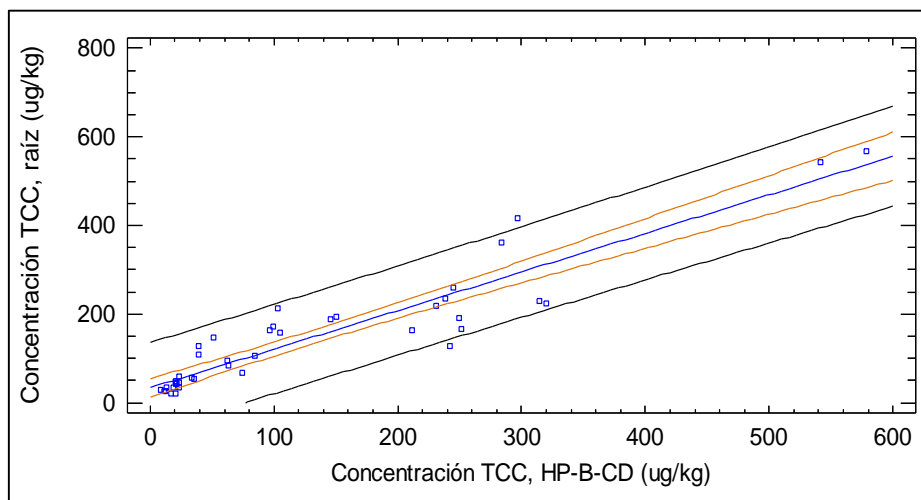


Figura 40: Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y HP- β -CD) para los sistemas tratados con distintas dosis de biosólido.

Para el modelamiento de las concentraciones de triclocarbán en las raíces del sistema GU-BGU y las correspondientes extracciones con HP- β -CD, se observa que existe una relación directa y positiva entre ellas (Figura 41).

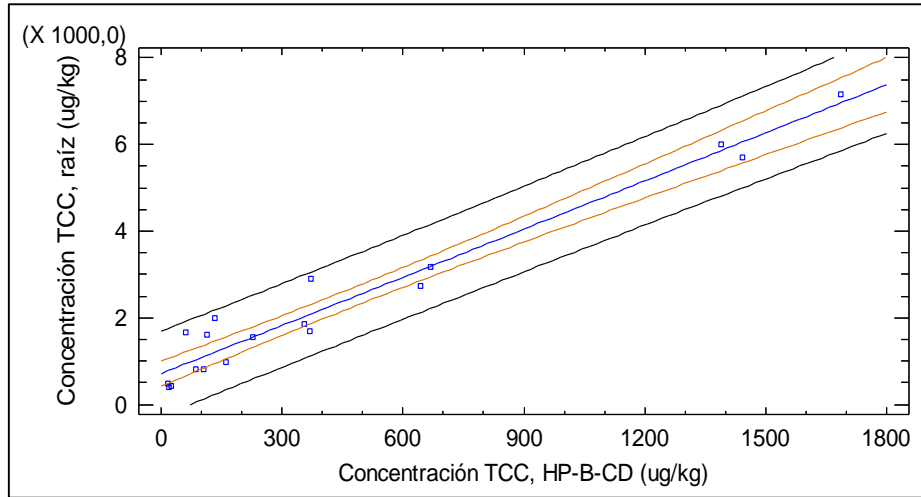


Figura 41: Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y HP-β-CD) para el sistema tratado con la misma dosis de biosólido.

En el modelamiento de las concentraciones de triclocarbán en las partes aéreas de los sistemas TQ-BLA-E, CL-BLA-E y GE-BCH con las extraídas con HP-β-CD, se observa que existe una relación directa y positiva entre ambas (Figura 42).

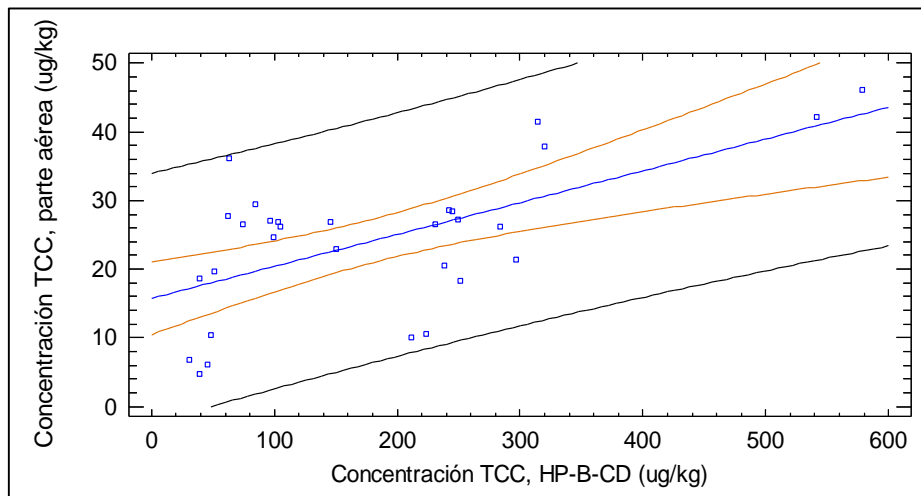


Figura 42: Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y HP-β-CD) para el sistema tratado con distintas dosis de biosólido.

En la Tabla 28, se resume la estadística de los modelos realizados para el método simulador con HP-β-CD (Figuras 40, 41 y 42). Se observa que existen relaciones estadísticamente significativas (p -value < 0,05).

Para las raíces, los coeficientes de correlación son mayores a 0,9 y presentan porcentajes de explicación del sistema mayores al 85%, indicando que la extracción con HP-β-CD es un método adecuado para simular el comportamiento de triclocarbán en las raíces de las plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólido, con distintas dosis (30, 60, 90 y 200 Mg ha⁻¹) e igual dosis (21 Mg ha⁻¹).

Al considerar los mismos parámetros para el modelo de la parte aérea con HP-β-CD, se observa que el coeficiente de correlación es 0,6 y un porcentaje de explicación del sistema de sólo un 37%. Esto se debe a que sólo tres de los seis sistemas (28 de los 56 experimentos desarrollados), se determinó triclocarbán en la parte aérea, por lo tanto, el sistema no presenta una descripción completa del comportamiento.

Tabla 28: Resumen estadístico del modelamiento con HP-β-CD.

Método simulador	Tejido	p -value	R	R ² (%)	Ecuación
HP-β-CD	Raíz ^a	0,0000*	0,9293	86,35	$C_{Raíz} = 33,9114 + 0,8704 C_{HP-β-CD}$
	Raíz ^b	0,0000*	0,9769	95,45	$C_{Raíz} = 708,135 + 3,7096 C_{HP-β-CD}$
	PA	0,0003*	0,6125	37,52	$C_{PA} = 15,7676 + 0,0464 C_{HP-β-CD}$

^a:Distinta dosis, ^b:Igual dosis, * : estadísticamente significativo

5.7.2. Modelamiento con EA/RDSE.

En la Figura 43, se observa la correlación simple entre la concentración de triclocarbán en las raíces de los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E y la extracción acuosa y RDSE_v (simultánea) correspondiente, existe una relación directa y positiva entre ellas.

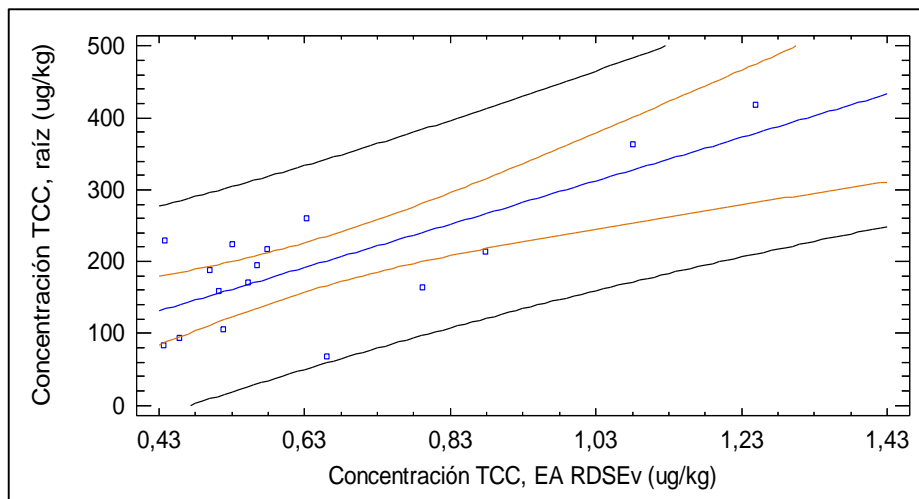


Figura 43: Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y EA/RDSE_v) para los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E.

Para el modelo realizado con las concentraciones de la parte aérea de los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E, y la extracción acuosa y RDSE_v (simultánea), se observa una relación directa y negativa (Figura 44).

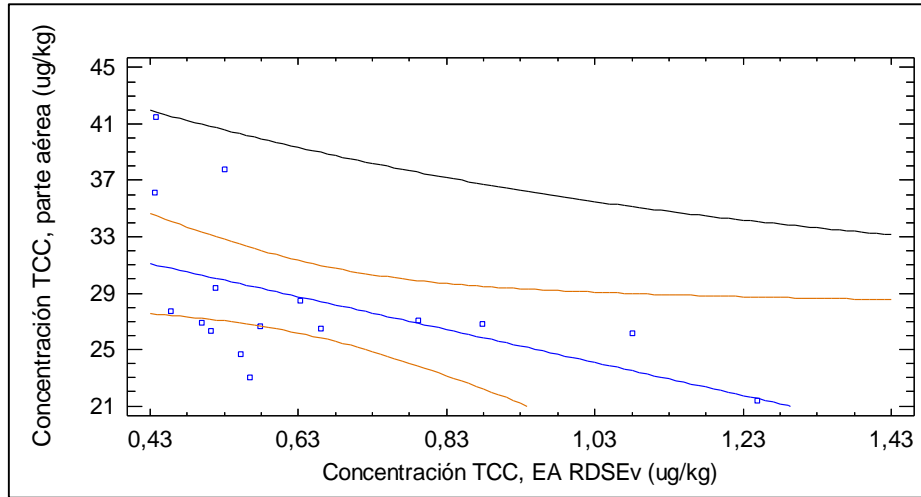


Figura 44: Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y EA/RDSE_v) para los sistemas TQ-BLA-E y CL-BLA-E.

En la Figura 45, se observa el modelo entre la concentración de triclocarbán en las raíces de los sistemas GE-BCH y GU-BGU y la extracción acuosa y RDSE_h correspondiente, existe una relación directa y positiva entre ellas.

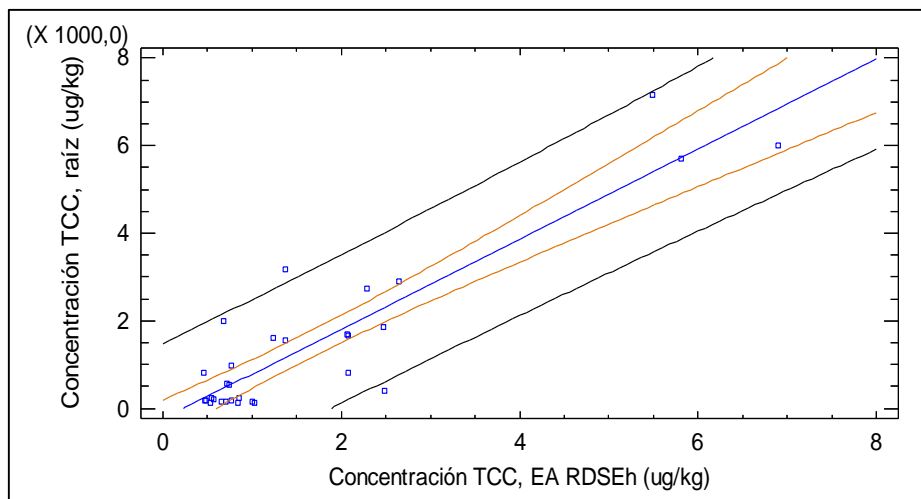


Figura 45: Modelamiento de concentraciones de TCC (raíces y EA/RDSE_h) para los sistemas GE-BCH y GU-BGU.

Para el modelo realizado con las concentraciones de la parte aérea de los sistemas GE-BCH y GU-BGU y la extracción acuosa y RDSE_h, se observa una relación directa y negativa (Figura 46).

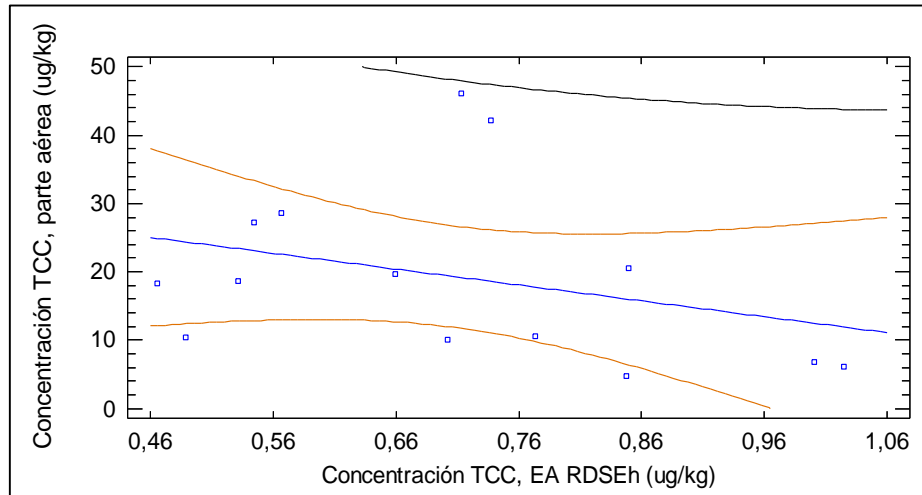


Figura 46: Modelamiento de concentraciones de TCC (parte aérea y EA/RDSE_h) para los sistemas GE-BCH.

En la Tabla 29, se presenta el resumen estadístico para los modelos realizados para el método simulador EA/RDSE. Se puede observar que las correlaciones realizadas con las raíces y la parte aérea para el disco vertical y con las raíces con el disco horizontal, son estadísticamente significativas (p -value < 0,05).

Para las raíces en ambas metodologías aplicadas (vertical y horizontal) se observan coeficientes de correlación mayores a 0,75 y porcentajes de explicación de un 57 y 81%, para cada método desarrollado, respectivamente. Cabe destacar que el método de extracción acuosa y extracción con disco rotatorio en modo vertical (EA/RDSE_v) y horizontal (EA/RDSE_h), presentan características

simuladoras para las raíces de las plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólido.

En los modelos desarrollados con las concentraciones de triclocarbán con la parte aérea y EA/RDSE, se observa que los coeficientes de correlación son del orden de 0,3 y 0,5 y los porcentajes de explicación del sistema varían entre 10 y 30%. Para ambos modelos, se necesita una mayor explicación del sistema, por lo tanto, un mayor número de experimentos donde sea posible determinar triclocarbán en la parte aérea de las plantas cultivadas en los sistemas suelo-biosólido.

Tabla 29: Resumen estadístico del modelamiento con EA/RDSE.

Método simulador	Tejido	p-value	R	R ² (%)	Ecuación
EA/RDSE _v	Raíz	0,0007*	0,7553	57,05	$C_{Raíz} = 1,4086 + 301,961 C_{EA/RDSE}$
	PA	0,0423*	-0,5127	26,29	$C_{PA} = 36,1065 - 11,6753 C_{EA/RDSE}$
EA/RDSE _h	Raíz	0,0000*	0,9047	81,85	$C_{Raíz} = -244,074 + 1028,61 C_{EA/RDSE}$
	PA	0,2618	-0,3219	10,36	$C_{PA} = 35,7567 - 23,2714 C_{EA/RDSE}$

PA: parte aérea, *: estadísticamente significativo

VI. CONCLUSIONES.

Las extracciones con HP- β -CD y EA/RDSE en modo vertical y horizontal, pueden ser llamadas simuladoras de la fracción biodisponible de triclocarbán, determinada en las raíces de las plantas de trigo, cultivadas en suelos tratados con biosólido, ya que presentan correlaciones directas, positivas, significativas, con coeficientes de correlación mayores a 0,75 y porcentajes de explicación de los sistemas estudiados mayores a 75%.

Entre las ventajas que presentan estas dos metodologías (extracción con HP- β -CD y la EA/RDSE), se encuentran que los resultados se obtienen entre 2 ó 3 días, en comparación a los 70 días que toma un estudio de biodisponibilidad, se generan menos desechos (disolventes orgánicos y residuos sólidos), además de requerir menos espacio, al compararla con la extracción en fase sólida que se realiza para determinar la fracción biodisponible de triclocarbán.

Para validar los métodos como biosimuladores, se realiza un modelamiento de las concentraciones de TCC en el tejido vegetal y las concentraciones determinadas a través de los métodos (HP- β -CD y EA/RDSE), a través de una correlación simple.

Para la extracción con ciclodextrina, se obtienen correlaciones significativas y que explican entre 37 y 95% de la variabilidad para las raíces y la parte aérea de las plantas de trigo, en los suelos tratados con biosólido en distintas dosis (30, 60, 90 y 200 Mg ha⁻¹) e igual dosis (21 Mg ha⁻¹), con TCC “nativo” y enriquecido.

Para el modo vertical de EA/RDSE, las correlaciones son significativas y explican entre el 26 y 57% de la variabilidad, para las raíces y la parte aérea, respectivamente. Para el modo horizontal (EA/RDSE_h), la correlación es significativa para las raíces, con una explicación del modelo de un 81%. Cabe destacar que las correlaciones para las partes aéreas con las metodologías de EA/RDSE poseen una pendiente negativa, lo que indica que al aumentar la concentración de TCC con la extracción con el método simulador, la concentración en la parte aérea disminuye.

VII. REFERENCIAS.

- Agyin-Birikorang, S., Miller, M., O'Connor, G.A., 2010. Retention-release characteristics of triclocarban and triclosan in biosolids, soils, and biosolids-amended soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1925–33. doi:10.1002/etc.251
- Al-Rajab, A.J., Sabourin, L., Scott, A., Lapen, D.R., Topp, E., 2009. Impact of biosolids on the persistence and dissipation pathways of triclosan and triclocarban in an agricultural soil. *Sci. Total Environ.* 407, 5978–5985. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.08.003
- Aryal, N., Reinhold, D.M., 2011. Phytoaccumulation of antimicrobials from biosolids: Impacts on environmental fate and relevance to human exposure. *Water Res.* 45, 5545–5552. doi:10.1016/j.watres.2011.08.027
- Bao, L.J., Jia, F., Crago, J., Zeng, E.Y., Schlenk, D., Gan, J., 2013. Assessing bioavailability of DDT and metabolites in marine sediments using solid-phase microextraction with performance reference compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1946–1953. doi:10.1002/etc.2275
- Barry, P.H., 1998. Derivation of unstirred-layer transport number equations from the Nernst-Planck flux equations. *Biophys. J.* 74, 2903–5. doi:10.1016/S0006-3495(98)77996-2
- Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils¹. *Agron. J.* 54, 464. doi:10.2134/agronj1962.00021962005400050028x
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018
- Briggs, G.G., Bromilow, R.H., Evans, A. a., 1982. Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley. *Pestic. Sci.* 13, 495–504. doi:10.1002/ps.2780130506
- Bright, D.A., Healey, N., 2003. Contaminant risks from biosolids land application:

- Contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. *Environ. Pollut.* 126, 39–49. doi:10.1016/S0269-7491(03)00148-9
- Caicedo, P., Schröder, A., Ulrich, N., Schröter, U., Paschke, A., Schüürmann, G., Ahumada, I., Richter, P., 2011. Determination of lindane leachability in soil-biosolid systems and its bioavailability in wheat plants. *Chemosphere* 84, 397–402. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.070
- Cañas, A., Richter, P., 2012. Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating disk: Determination of hexachlorobenzene in water. *Anal. Chim. Acta* 743, 75–79. doi:10.1016/j.aca.2012.07.019
- Cañas, A., Valdebenito, S., Richter, P., 2014. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma. *Microextraction Techniques. Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2205–2210. doi:10.1007/s00216-014-7628-8
- Cha, J., Cupples, A.M., 2010. Triclocarban and triclosan biodegradation at field concentrations and the resulting leaching potentials in three agricultural soils. *Chemosphere* 81, 494–499. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.040
- Chemicalize, 2015a. Estructura de polidimetilsiloxano (PDMS) [WWW Document]. URL <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=PDMS&source=fp> (accessed 8.26.15).
- Chemicalize, 2015b. Triclocarban [WWW Document]. URL <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=triclocarban&source=fp> (accessed 1.10.16).
- Chiu, V.M., Lukus, P. a, Doyle, J.L., Schenk, J.O., 2011. Mass transport at rotating disk electrodes: effects of synthetic particles and nerve endings. *Anal. Biochem.* 418, 58–65. doi:10.1016/j.ab.2011.07.003
- Chu, S., Metcalfe, C.D., 2007. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J.*

- Chromatogr. A 1164, 212–218. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.024
- CIREN, 2003. Descripciones de suelos, materiales y símbolos: Estudio Agrológico V Región.
- CIREN, 1996. Descripciones de suelos, materiales y símbolos: Estudio Agrológico Región Metropolitana.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226–247. doi:10.1016/j.envint.2010.06.004
- Contreras, H., 2001. *Ciclodextrinas naturaleza, propiedades y aplicaciones*, 1st ed. Universidad de Guadalajara.
- Corrotea, Y., Richter, P., Brown, S., Sepúlveda, B., Ascar, L., Ahumada, I., 2016. Determination of the bioavailable fraction of triclosan in biosolid-treated soils using a predictive method and wheat plant bioassays. *J. Soils Sediments* 16, 1538–1546. doi:10.1007/s11368-015-1348-3
- Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W., 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46, 1235–1245. doi:10.1016/S0045-6535(01)00199-0
- Del Valle, E.M.M., 2004. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* 39, 1033–1046. doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- Díaz-Cruz, M.S., García-Galán, M.J., Guerra, P., Jelic, a., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M.J., Petrovic, M., Barceló, D., Petrovic, M., Barceló, D., 2009. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 1263–1275. doi:10.1016/j.trac.2009.09.003
- Duan, M.S., Zhao, N., Ossurardóttir, I.B., Thorsteinsson, T., Loftsson, T., 2005. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. *Int. J. Pharm.* 297, 213–22. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.04.007

- Engler, K.N., Lemley, A.T., 2013. Development of an in vitro thin-film solid-phase microextraction method to determine the bioavailability of xenoestrogens in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1962–1968. doi:10.1002/etc.2292
- Epstein, E., 2003. Land application of sewage sludge and biosolids, First. ed. Lewis Publishers, CRC Press.
- Gillespie, J., Wicklund, R., Miller, M., 1971. Soils of Halton County.
- Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., Lapen, D.R., 2012. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere* 87, 194–203. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.018
- Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U . S . Water Resources 39, 6335–6336.
- Halden, R.U., Paull, D.H., 2004. Analysis of triclocarban in aquatic samples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4849–4855. doi:10.1021/es049524f
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., 2009. Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2580–2586. doi:10.1897/09-013.1
- ISO, 2008. ISO/TS 21268-2:2007 Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials.
- Jachero, L., Ahumada, I., Fuentes, E., Richter, P., 2015. New biomimetic approach to determine the bioavailability of triclosan in soils and its validation with the wheat plant uptake bioassay. *Chemosphere* 119, 1062–1067. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.09.030
- Jachero, L., Ahumada, I., Richter, P., 2014. Rotating-disk sorptive extraction: Effect of the rotation mode of the extraction device on mass transfer efficiency. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2987–2992. doi:10.1007/s00216-014-7693-z

- Jachero, L., Sepúlveda, B., Ahumada, I., Fuentes, E., Richter, P., 2013. Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 7711–7716. doi:10.1007/s00216-012-6679-y
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 39–47. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.08.014
- Liu, H.C., Hwu, C.S., Chu, K.C., Lu, C.J., 2010. Estimation of bioavailability and potential risks of naphthalene in soils with solid phase microextraction. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1311–1316. doi:10.1007/s11274-009-0302-1
- Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., Richter, P., 2014. Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta* 128, 486–492. doi:DOI 10.1016/j.talanta.2014.06.003
- Mata, A., Fleischman, A.J., 2005. Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro / Nanosystems. *Biomed. Microdevices* 2, 281–293.
- McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Res.* 44, 658–668. doi:10.1016/j.watres.2009.12.032
- Ministerio del Medio Ambiente, 2012. Uso benefico de los biosolidos generados en las plantas de tratamiento de aguas servidas.
- National Cooperative Soil Survey, 2008. Genesee Series [WWW Document]. URL https://soilseries.sc.egov.usda.gov/OSD_Docs/G/GENESEE.html (accessed 8.11.15).
- O'Connor, G.A., 1996. Organic compounds in sludge-amended soils and their potential for uptake by crop plants. *Sci. Total Environ.* 185, 71–81. doi:10.1016/0048-9697(95)05043-4
- Pannu, M.W., Toor, G.S., O'Connor, G. a., Wilson, P.C., 2012. Toxicity and bioaccumulation of biosolids-borne triclosan in food crops. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2130–2137. doi:10.1002/etc.1930

- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D., Shiu, W.Y., 1990. Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21, 297–331. doi:10.1016/0045-6535(90)90002-B
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L. a., Etxebarria, N., Zuloaga, O., 2010. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A* 1217, 2642–2666. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051
- Prosser, R.S., Lissemore, L., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2014a. Toxicity of biosolids-derived triclosan and triclocarban to six crop species. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1840–1848. doi:10.1002/etc.2624
- Prosser, R.S., Lissemore, L., Topp, E., Sibley, P.K., 2014b. Bioaccumulation of triclosan and triclocarban in plants grown in soils amended with municipal dewatered biosolids. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 975–984. doi:10.1002/etc.2505
- Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepúlveda, B., 2009. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *J. Chromatogr. A* 1216, 8598–8602. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.044
- Sabourin, L., Beck, A., Duenk, P.W., Kleywegt, S., Lapen, D.R., Li, H., Metcalfe, C.D., Payne, M., Topp, E., 2009. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. *Sci. Total Environ.* 407, 4596–4604. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.04.027
- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D.R., Topp, E., 2012. Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* 431, 233–236. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.017
- Sadzawka, A., Carrasco, M.A., Gez, R., Mora, M.D.L.L., Flores, H., Neaman, A., 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revision 2006., Serie Actas-Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
- Smith, M.D., Hill, E.M., 2006. Profiles of short chain oligomers in roach (*Rutilus rutilus*)

- exposed to waterborne polyethoxylated nonylphenols. *Sci. Total Environ.* 356, 100–111. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.04.020
- Snyder, E.H., O'Connor, G.A., 2013. Risk assessment of land-applied biosolids-borne triclocarban (TCC). *Sci. Total Environ.* 442, 437–444. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.10.007
- Snyder, E.H., O'Connor, G. a., McAvoy, D.C., 2011. Toxicity and bioaccumulation of biosolids-borne triclocarban (TCC) in terrestrial organisms. *Chemosphere* 82, 460–467. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.054
- Snyder, E.H., O'Connor, G. a., McAvoy, D.C., 2010a. Measured physicochemical characteristics and biosolids-borne concentrations of the antimicrobial Triclocarban (TCC). *Sci. Total Environ.* 408, 2667–2673. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.001
- Snyder, E.H., O'Connor, G. a., McAvoy, D.C., 2010b. Fate of 14C-triclocarban in biosolids-amended soils. *Sci. Total Environ.* 408, 2726–2732. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.005
- Subsecretaría General de la República, 2009. Decreto 4: Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas. D. Of. la República Chile 11–14.
- Tao, S., Guo, L.Q., Wang, X.J., Liu, W.X., Ju, T.Z., Dawson, R., Cao, J., Xu, F.L., Li, B.G., 2004. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *Sci. Total Environ.* 320, 1–9. doi:10.1016/S0048-9697(03)00452-2
- Tapia, F., González, S., 2005. Lodos de plantas depuradoras de agua servidas: Su valor como fertilizante en cultivos anuales. *Tierra Adentro*, INIA 10–13.
- Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, H., 2004. Peer Reviewed: Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 392A–399A. doi:10.1021/es040639t
- Triclocarban [CASRN 101-20-2] Potential Designated Chemical, 2010. , in: Meeting of Scientific Guidance Panel (SGP). pp. 1–8.

- U.S. EPA, 2014a. Water: Contaminants of emerging concern [WWW Document]. URL <http://water.epa.gov/scitech/cec/>
- U.S. EPA, 2014b. Technical Fact sheet – Nanomaterials At a Glance 1–9.
- U.S. EPA, 2012a. Pharmaceutical and personal care products [WWW Document]. URL <http://www.epa.gov/ppcp/>
- U.S. EPA, 2012b. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) Basic information [WWW Document]. URL <http://www.epa.gov/ppcp/basic2.html>
- U.S. EPA, 2009. Targeted National Sewage Sludge Survey Statistical Analysis Report 58. doi:EPA-822-R-08–014
- U.S. EPA, 2007a. Frequently asked questions, Sewage sludge (biosolids) [WWW Document]. URL <http://water.epa.gov/polwaste/wastewater/treatment/biosolids/genqa.cfm> (accessed 7.23.15).
- U.S. EPA, 2007b. Method 1694 : Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS, EPA Method.
- U.S. EPA, 2002. High Production Volume (HPV) Chemical Challenge Program Data Availability and Screening Level Assessment for Triclocarban. Rep. No. 201-14186A.
- U.S. EPA, 1999. Biosolids generation, use, and disposal in the United States.
- U.S. FDA, 2016a. Antibacterial Soap ? You Can Skip It — Use Plain Soap and Water.
- U.S. FDA, 2016b. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use [WWW Document]. URL <https://www.federalregister.gov/documents/2016/09/06/2016-21337/safety-and-effectiveness-of-consumer-antiseptics-topical-antimicrobial-drug-products-for> (accessed 10.3.16).
- Venkatesan, A.K., Pycke, B.F.G., Barber, L.B., Lee, K.E., Halden, R.U., 2012. Occurrence of triclosan, triclocarban, and its lesser chlorinated congeners in

- Minnesota freshwater sediments collected near wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 229–230, 29–35. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.049
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Res.* 44, 6011–6020. doi:10.1016/j.watres.2010.07.051
- Waters Inc., 2015. Oasis, sample preparation products [WWW Document]. URL http://www.waters.com/waters/es_CL/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?locale=es_CL&cid=513209
- Waters Inc., 2011. Oasis, sample extraction products.
- Wong, F., Bidleman, T.F., 2010. Hydroxypropyl-B-cyclodextrin as non-exhaustive extractant for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in muck soil. *Environ. Pollut.* 158, 1303–1310. doi:10.1016/j.envpol.2010.01.016
- Wright, P., Scharpf, L., Levinskas, G., 1975. Pharmacokinetic and toxicologic studies with triclocarban, in: *Toxicology Applied Pharmacology*. p. 171.
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., 2009. Adsorption and degradation of triclosan and triclocarban in soils and biosolids-amended soils. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4900–4905. doi:10.1021/jf900376c
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Czajkowski, K.P., 2010. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6157–6161. doi:10.1021/es1011115
- Wu, C., Spongberg, A.L., Witter, J.D., Sridhar, B.B.M., 2012. Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 85, 104–109. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.08.007
- Wu, X., Ernst, F., Conkle, J.L., Gan, J., 2013. Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables.

Environ. Int. 60, 15–22. doi:10.1016/j.envint.2013.07.015

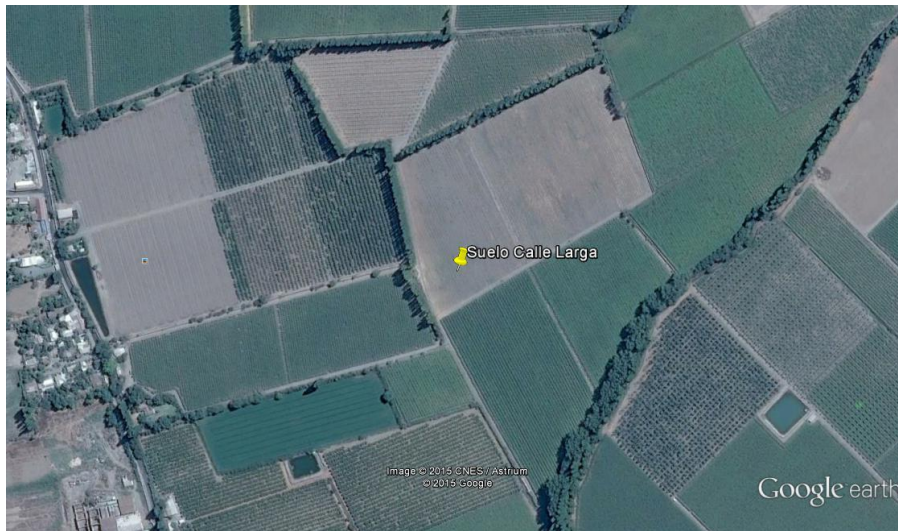
Ying, G.G., Kookana, R.S., 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. Environ. Int. 33, 199–205. doi:10.1016/j.envint.2006.09.008

VIII. ANEXOS.

ANEXO 1. Ubicación geográfica de los suelos.



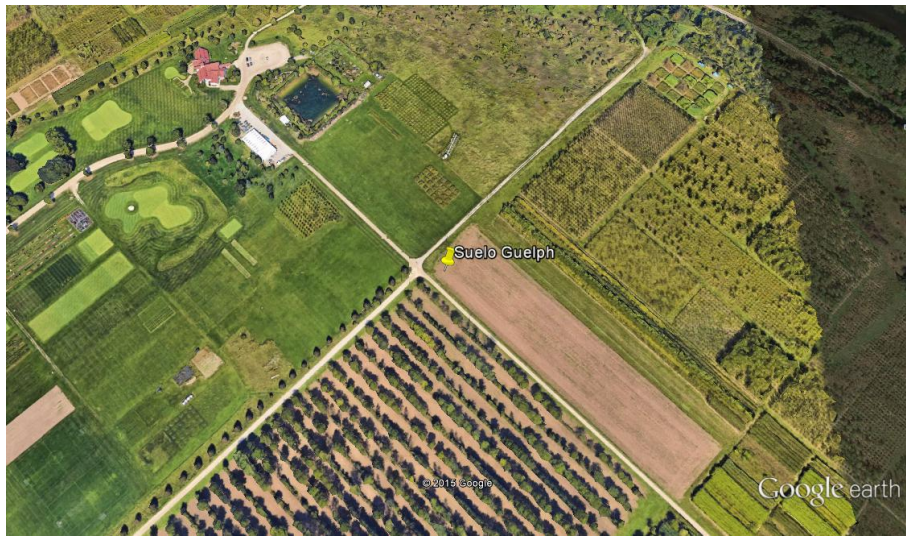
Anexo 1.a: Suelo Taqueral.



Anexo 1.b: Suelo Calle Larga.



Anexo 1.c: Suelo Genesee.



Anexo 1.d: Suelo Guelph.

ANEXO 2. Cálculo de las dosis de biosólido.

Anexo 2.a: Suelo Taqueral

Dosis (Mg ha⁻¹)	Suelo (g)	BLA (g)	Total sistema (g)
0	510,8	0	510,8
30	510,8	7,0	517,8
60	510,8	14,1	524,9
90	510,8	21,1	531,9
200	510,8	46,9	557,7

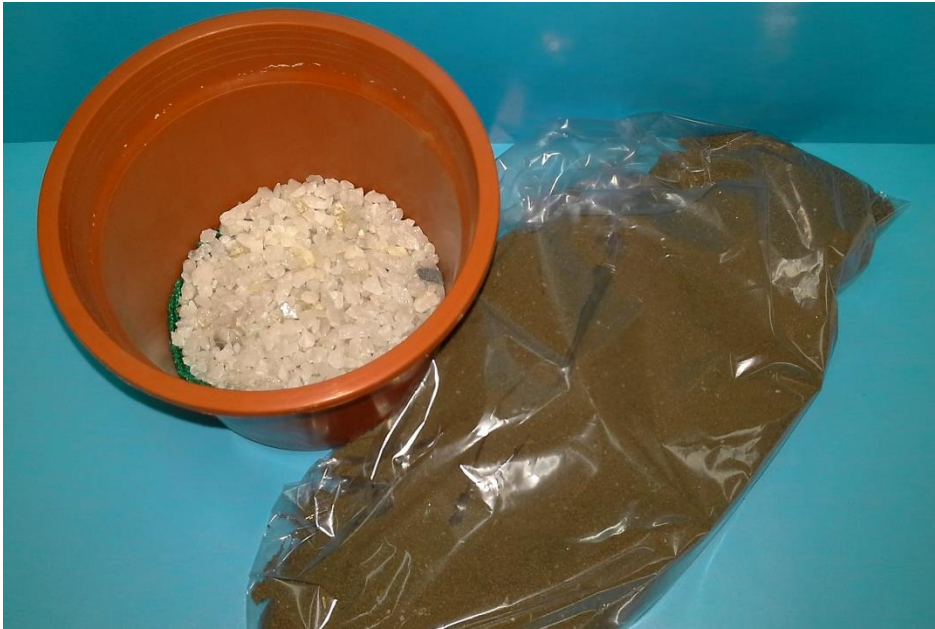
Anexo 2.b: Suelo Calle Larga

Dosis (Mg ha⁻¹)	Suelo (g)	BLA (g)	Total sistema (g)
0	525,6	0	525,6
30	525,6	7,7	533,3
60	525,6	15,7	541,3
90	525,6	23,1	548,7
200	525,6	51,3	576,9

Anexo 2.c: Suelo Genesee

Dosis (Mg ha⁻¹)	Suelo (g)	BCH (g)	Total sistema (g)
0	490,0	0	490,0
30	490,0	9,6	499,6
60	490,0	19,3	509,3
90	490,0	28,9	518,9
200	490,0	64,3	554,3

ANEXO 3. Esquema de preparación de las dosis.





ANEXO 4. Gráficos utilizados cálculo de FBC-R.

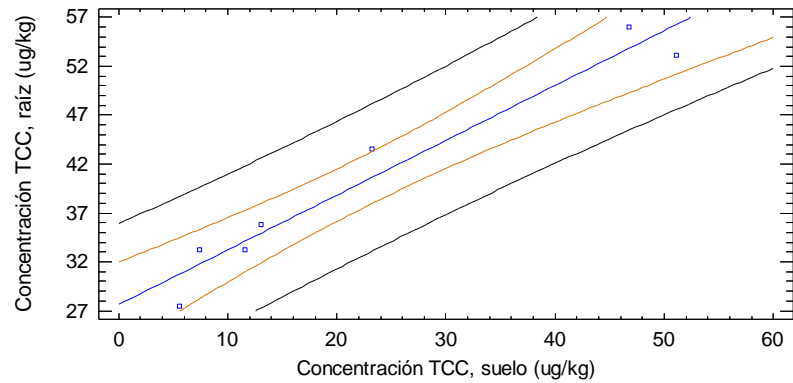


Figura 47: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA.

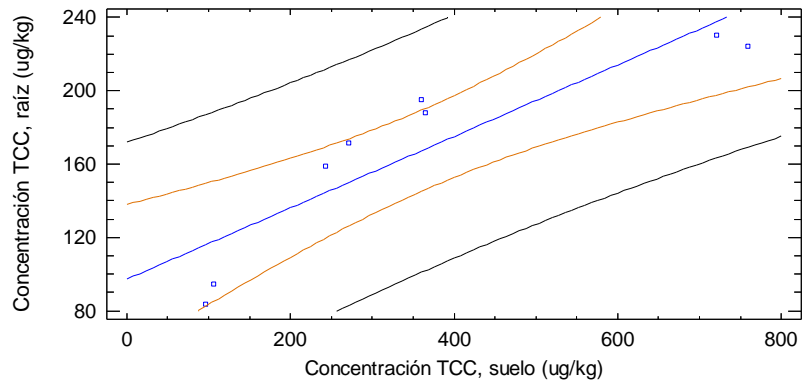


Figura 48: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA-E.

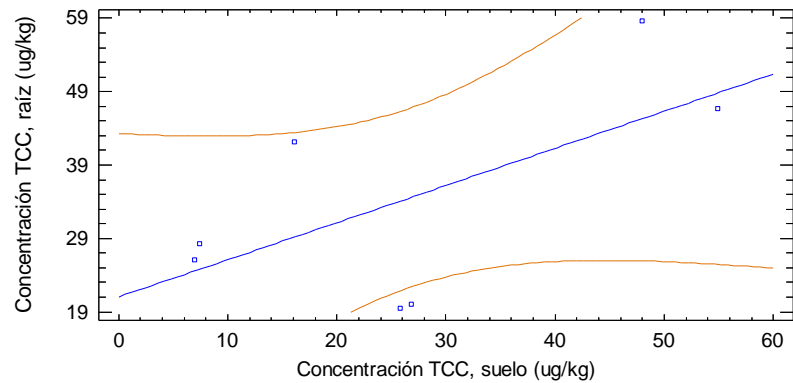


Figura 49: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA.

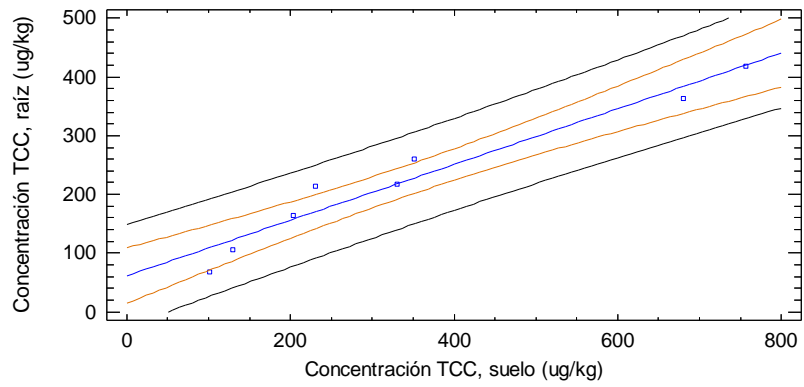


Figura 50: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA-E.

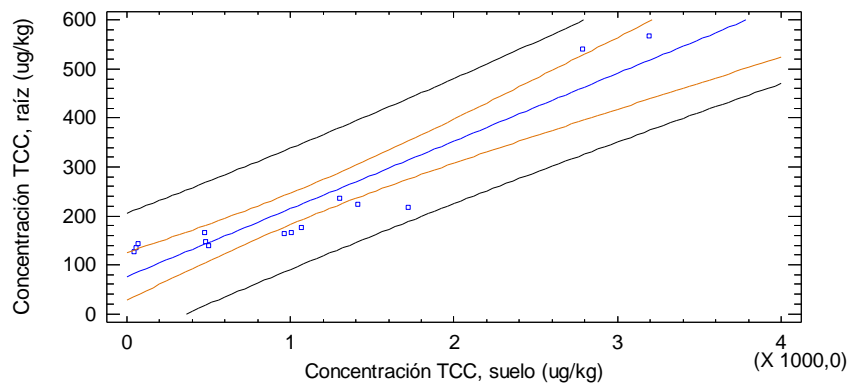


Figura 51: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GE-BCH.

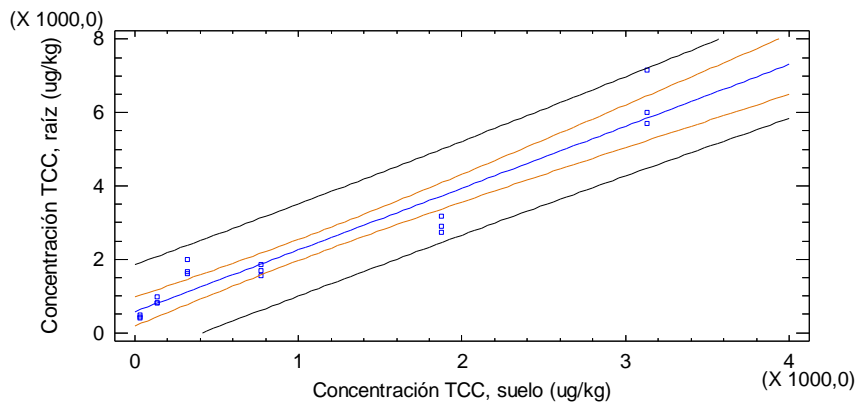


Figura 52: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GU-BGU.

ANEXO 5. Gráficos utilizados cálculo de FBC-PA.

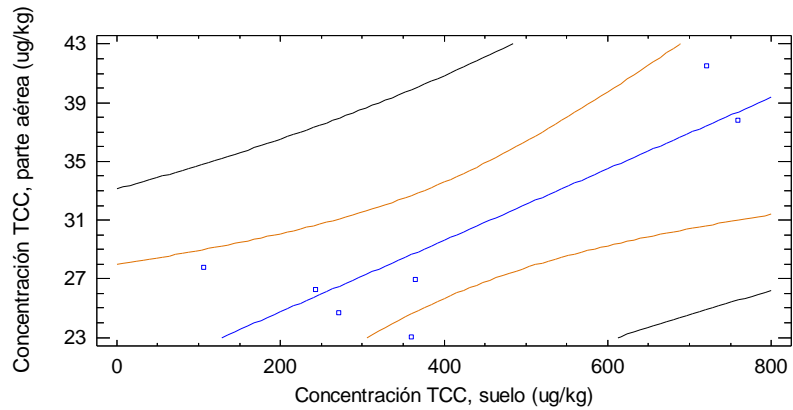


Figura 53: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA-E.

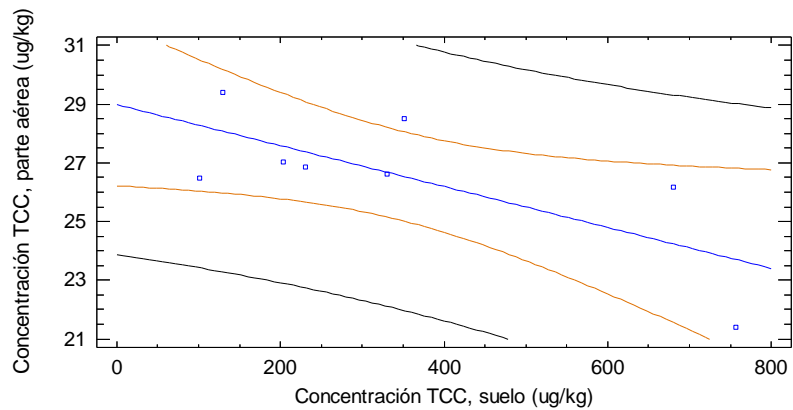


Figura 54: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA-E.

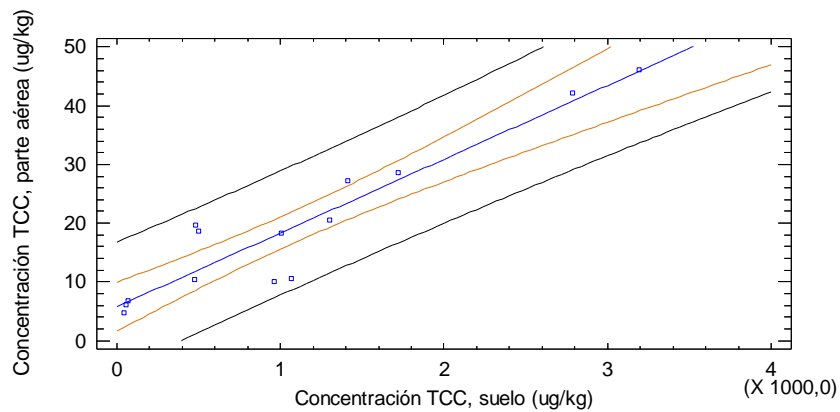


Figura 55: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GE-BCH.

ANEXO 6. Gráficos utilizados cálculo de FC-HP- β -CD.

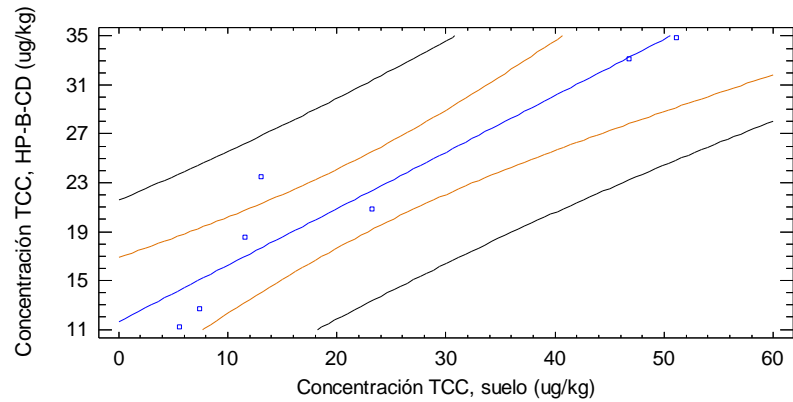


Figura 56: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA.

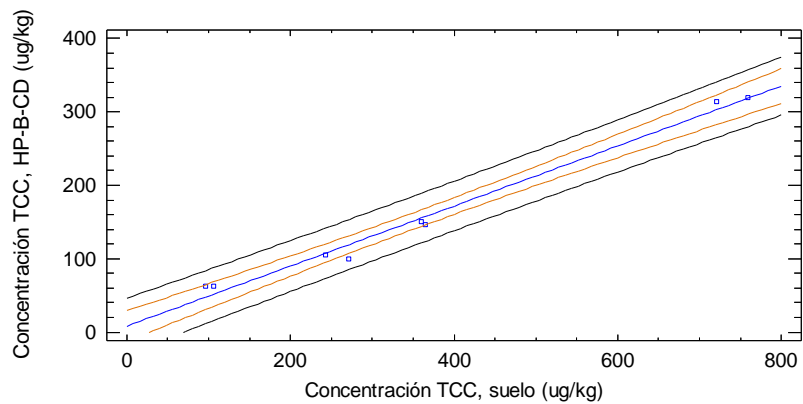


Figura 57: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA-E.

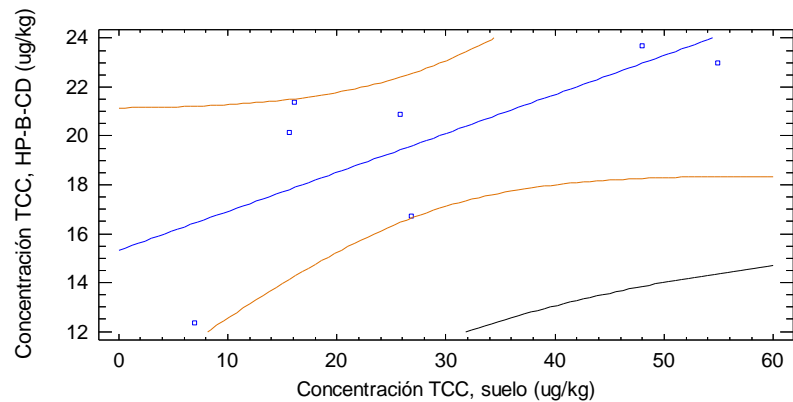


Figura 58: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA.

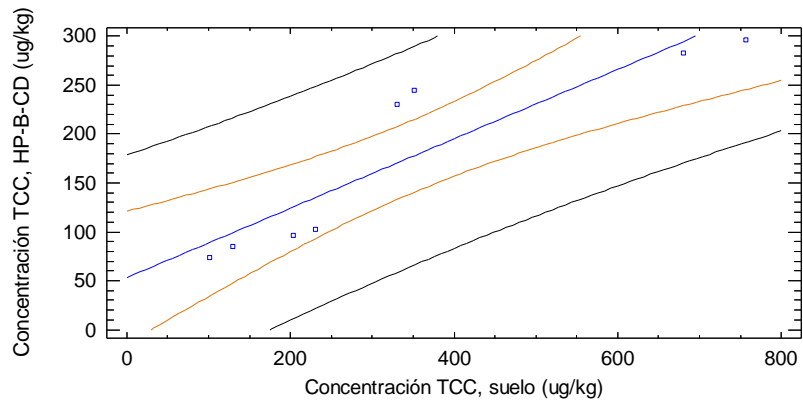


Figura 59: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA-E.

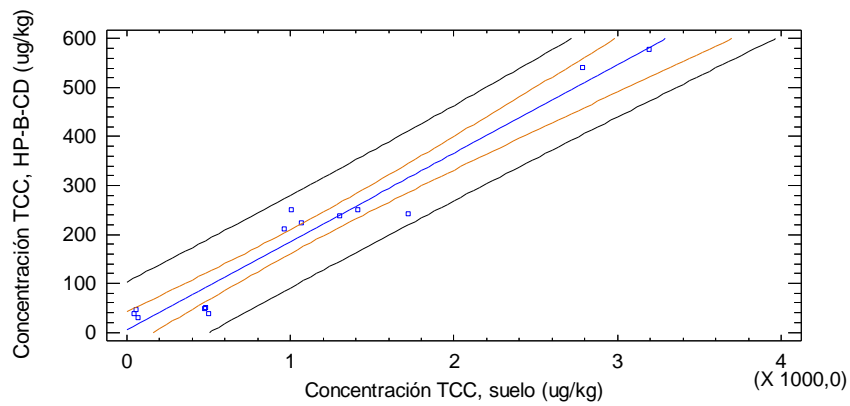


Figura 60: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GE-BCH.

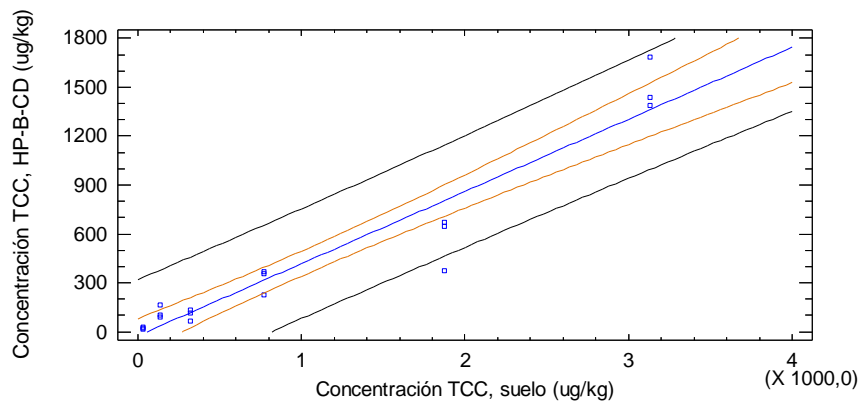


Figura 61: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GU-BGU.

ANEXO 7. Gráficos utilizados cálculo de FC-EA/RDSE.

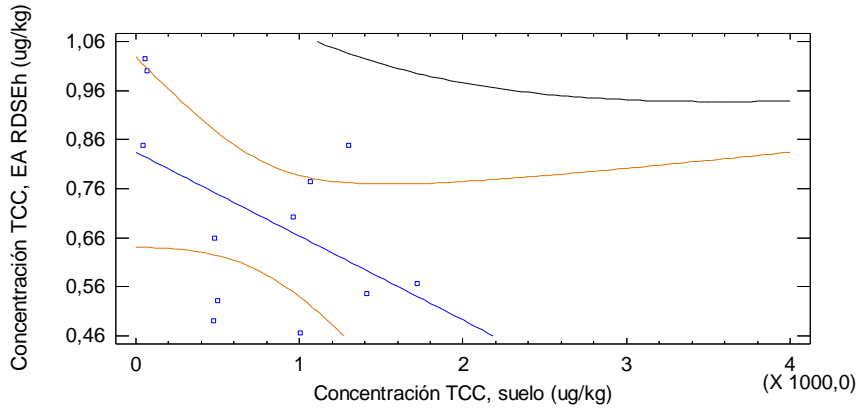


Figura 62: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GE-BCH.

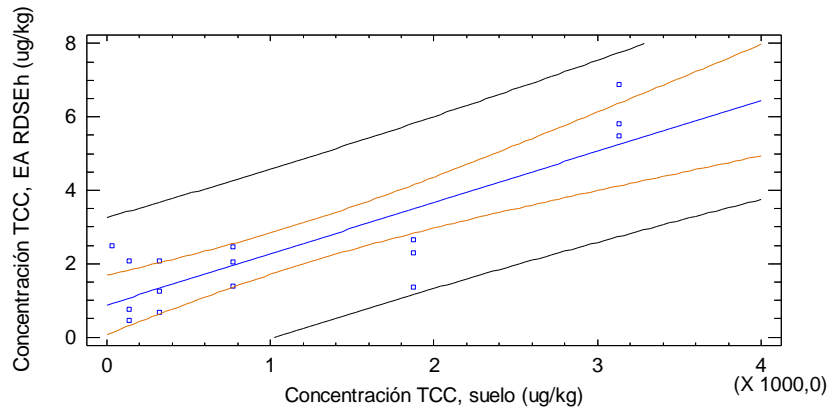


Figura 63: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema GU-BGU.

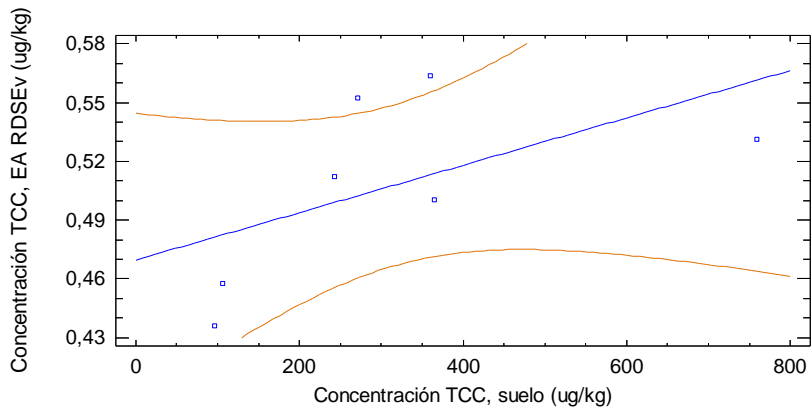


Figura 64: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema TQ-BLA-E.

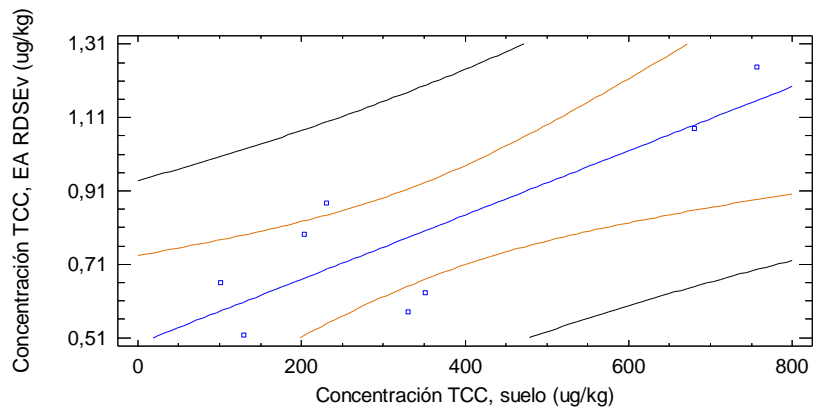


Figura 65: Modelamiento de concentraciones de TCC para sistema CL-BLA-E.