

UCH-FC
Q. Ambiental
G 633.
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y BIODISPONIBILIDAD DE ESTRONA,
17 β -ESTRADIOL Y DE α -ETINILESTRADIOL EN SUELOS AGRÍCOLAS
RESTAURADOS CON BIOSÓLIDOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

Paulina Isabel Gómez Santander

Director de Seminario de Título: M.Q. Inés Ahumada Torres

Co-Director: Dra. María Loreto Ascar Estay

Profesor Patrocinante: M.Cs. Sylvia Copaja Castillo

Agosto de 2016

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y BIODISPONIBILIDAD DE ESTRONA, 17 β -ESTRADIOL Y DE α -ETINILESTRADIOL EN SUELOS AGRÍCOLAS RESTAURADOS CON BIOSÓLIDOS”

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

PAULINA ISABEL GÓMEZ SANTANDER

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

Comisión de Evaluación

M.Q. Inés Ahumada Torres

Director Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo

Profesor Patrocinante

M. Cs. Héctor Bravo Vergara

Presidente

Dra. Tatiana Garrido Reyes

Corrector



Agosto de 2016

Santiago – Chile

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de esta valiosa etapa de mi vida, no podría continuar sin agradecer a quienes han sido partícipes de esta experiencia y han hecho posible este logro.

A mis padres, María Isabel y Heriberto, a quienes les debo prácticamente todo lo que soy ahora. Por los valores entregados, por la educación que me brindaron y por el cariño que nunca faltó en el hogar. Por esforzarse para que mi hermano y yo tuviéramos un ambiente propicio para estudiar, por las sobremesas de las que tanto aprendí. Gracias, también por transmitirme sus ideales de igualdad y preocupación por los demás, de construir a partir de uno mismo, un mundo más justo y honesto. Espero de corazón, no defraudarlos nunca.

Agradecer a mi familia completa, por estar presente en cada momento importante, por no faltar nunca en los momentos difíciles. Sobre todo agradecer a mi prima Bárbara, por ser tan cariñosa y especial conmigo, por ofrecerme lo que esté a su alcance para ayudarme a toda hora.

Agradezco a cada uno de los profesores que contribuyeron en mi formación académica, por su voluntad y entusiasmo en la enseñanza de las ciencias, promoviendo una visión crítica y profunda frente a la contingencia y depositando en cada alumno la responsabilidad de construir una sociedad mejor.

Agradezco a la profesora Cecilia Labbé por aceptarme, con mi poca experiencia, en su laboratorio, donde aprendí muchísimo y también puse en ejercicio la perseverancia por encima de las dificultades. A María Inés, que fue una excelente guía de trabajo, de quien podría enumerar un sinnúmero de virtudes, pero por sobre todo agradecer su paciencia y cariño.

Agradezco profundamente el apoyo y la dedicación de las profesoras que patrocinaron y dirigieron este seminario de título. A la profesora Inés Ahumada, por confiar en mí sin precedentes, por su preocupación constante y por su ayuda en lo que fuese necesario. A la profesora Loreto Ascar, por su buena disposición, por su simpatía y

por resolver todo tipo de dudas que surgieron en este gran desafío. A Cristina Pedraza por alegrar cada uno de los días que pasé en el laboratorio, por guiarme en cada procedimiento nuevo, por ser mi compañera de trabajo y además por aliviarme en los momentos difíciles.

A la profesora Sylvia Copaja, por su compromiso y dedicación en cada una de mis etapas de la universidad. Por demostrar preocupación en cada paso a seguir, sin dejar nada al azar. Muchas gracias por contribuir en el término de esta experiencia, por aceptarme en su laboratorio y enseñarme lo necesario. Gracias también al equipo humano que me asistió en todo momento y con quien también compartí risas y frustraciones.

A Marisol por ser tan diligente y hacer expedito todos los trámites de titulación. Por su simpatía y buen humor.

A mis amigas y amigos de la universidad con quien compartí un sinfín de aventuras, viajes, anécdotas, marchas y tantos viernes. Nunca pensé que iba a extrañar los laboratorios hasta tarde, amanecer estudiando o pasar el día entero en la biblioteca. La verdad es que con ustedes todo eso fue muy ameno y grato, el tiempo se me pasó muy rápido. Gracias a todos.

A mis amigas y amigos de la vida, con quienes tuve la suerte de encontrarme en situaciones azarosas, que agradezco hasta el día de hoy.

Agradecer al equipo completo del Preuniversitario Popular Víctor Jara, la organización que marcó un antes y un después en mi etapa universitaria, donde pude canalizar mi energía y mis ganas de generar un cambio, que por muy pequeño que parezca, no escatima en entrega y voluntad. Agradecer en especial a la sede Recoleta, que desde su inicio hasta hoy, ha forjado un grupo de trabajo con una calidad humana que difícilmente encontraré en otro lugar. Gracias a ustedes, por la colaboración en todas mis tareas y por incentivarme a mejorar cada día.

También agradecer al proyecto FONDECYT 1150502 por el financiamiento de este seminario de título.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii
SUMARY.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes Generales.....	1
1.1.1 Tratamiento de aguas servidas.....	1
1.1.2 Tratamiento de lodos y obtención de biosólidos.	1
1.1.3 Legislación en gestión de los biosólidos.....	2
1.1.4 Contaminantes Emergentes y su efecto en la salud.	4
1.1.4.1 Hormonas esteroidales estrogénicas.	5
1.1.5 Impacto ambiental de estrógenos presentes en cuerpos de agua.	7
1.1.6 Estrógenos en suelos agrícolas.	9
1.1.6.1 Degradación de estrógenos en suelos.....	10
1.2 Antecedentes Específicos.	10
1.2.1 Técnicas cromatográficas para detectar estrógenos en matrices ambientales. 10	
1.2.1.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS)..	11
1.2.1.2 Extracción de compuestos orgánicos desde la matriz.	11
1.2.1.3 Eliminación de Interferentes (“clean up”).....	12
1.2.2 Biodisponibilidad de contaminantes en suelos agrícolas enmendados con biosólidos.....	13
1.2.2.1 Uso de ciclodextrinas como Biosimuladores para estudios de biodisponibilidad.....	14
1.2.3 Propuesta del Seminario	16
1.3 Hipótesis.....	17
1.4 Objetivos	17
1.4.1 Objetivo General.....	17
1.4.2 Objetivos Específicos	17

II. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Reactivos	18
2.2 Estándares.....	18
2.3 Materiales	19
2.4 Semillas	19
2.5 Instrumentos y Equipos	19
2.6 Cromatógrafo GC/MS.	20
2.7 Caracterización fisicoquímica de los Suelos y del Biosólido.....	21
2.7.1 Determinación de pH.	21
2.7.2 Determinación de conductividad eléctrica.....	21
2.7.3 Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).	22
2.7.4 Determinación de Carbono Orgánico (CO).	22
2.7.6 Determinación de la Textura de los suelos.	24
2.7.7 Determinación de Nitrógeno total mediante digestión Kjeldalh.	25
2.8 Análisis químico.....	26
2.8.1 Identificación de estrógenos mediante GC/MS.	26
2.9 Tratamiento de muestras para la determinación de las hormonas E1, E2 y EE2. ..	27
2.9.1 Purificación de los extractos (“clean up”).	27
2.9.2 Derivatización de los extractos.	27
2.10 Determinación de la biodisponibilidad de las hormonas estrogénicas mediante bioensayo con plantas de trigo.....	28
2.10.1 Enriquecimiento del biosólido con E1, E2 y EE2.	28
2.10.2 Determinación de la fracción biodisponible de hormonas estrogénicas con plantas de trigo como bioindicador.....	28
2.11 Estimación de la fracción biodisponible de hormonas, usando un método biosimulador de extracción con solución de ciclodextrina.	30
2.12 Estudio de la actividad microbiana.....	30
2.12.1 Determinación de CO ₂ por titulación con HCl.	30
2.12.2 Determinación de nitrato (NO ₃ ⁻) y amonio (NH ₄ ⁺) por cromatografía iónica	31

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1 Caracterización física y química de los suelos y del biosólido.	33
3.2 Optimización de la metodología de extracción de las hormonas E1, E2 y EE2. ...	35
3.3 Optimización de la derivatización de las hormonas E1, E2 y EE2	37
3.4 Determinación del contenido de hormonas en el biosólido.....	42
3.5 Determinación de la fracción biodisponible de las hormonas E1, E2 y EE2 mediante un bioensayo con plantas de trigo.....	42
3.5 Determinación de la fracción biodisponible de las hormonas E1, E2 y EE2 mediante un método biosimulador con ciclodextrina.....	46
3.7 Determinación de la biomasa de las plantas cultivadas en suelos tratados con biosólido.	50
3.8 Determinación de la actividad microbiana	51
IV. CONCLUSIONES	55
V. REFERENCIAS	57
VI. ANEXOS.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones máximas de metales pesados en suelo receptor y biosólido....	3
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las hormonas estrogénicas.	7
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de los suelos y del biosólido.....	33
Tabla 4. Metales pesados en los suelos y en el biosólido.	34
Tabla 5. Porcentajes de recuperación de las hormonas estrogénicas en la etapa de limpieza de los extractos (n=3).....	36
Tabla 6. Porcentaje de recuperación de las hormonas estrogénicas tras cambiar de solvente en la elusión de la muestra (n=3).....	36
Tabla 7. Tiempos de retención y masas de los iones correspondientes a los compuestos sililados.	41
Tabla 8. Límite de detección y cuantificación del instrumento y coeficiente de variación del método.....	42
Tabla 9. Factor de bioconcentración de las plantas cultivadas en suelos tratados con biosólido natural y enriquecido con hormonas E1, E2 y EE2.	45
Tabla 10. Resultado de la optimización de solvente de extracción de las hormonas estrogénicas (n=3).....	46
Tabla 11. Factor de bioconcentración del método biosimulador con ciclodextrina (HPCD).	49
Tabla 12. Correlación del método biosimulador con los resultados obtenidos en el cultivo de plantas de trigo para EE2.	49
Tabla 13. Cálculo para el tratamiento de suelo con biosólido en 90 Mgha ⁻¹	65
Tabla 14. Corrección mediante factor de humedad.	65
Tabla 15. Peso húmedo de suelo y biosólido utilizado en cada maceta para plantar trigo.	65

Tabla 16. Biomasa de las plantas de trigo.....	65
Tabla 17. Concentración de hormonas encontradas en plantas de trigo cultivadas en los suelos tratados con 90 Mgha ⁻¹ de biosólido natural y enriquecido con 10 mgkg ⁻¹ de hormonas E1, E2 y EE2.	66
Tabla 18. Extracción de E1, E2 y EE2 con ciclodextrina (HPCD).....	67
Tabla 19. Determinación de CO ₂ en los suelos tratados con biosólido (mg de CO ₂ en 100 g de suelo).....	67
Tabla 20. Determinación de amonio y nitrato en suelos tratados con biosólido.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del estriol (E3), principal producto de excreción en animales.	6
Figura 2: Estructura molecular de 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2) y estrona (E1).	6
Figura 3: Estructura química de la fase sorbente Oasis HLB.	12
Figura 4: Representación de una ciclodextrina.	15
Figura 5: Representación de una ciclodextrina, indicando las regiones hidrofóbicas (cavidad) e hidrofílica (exterior).	15
Figura 6: Triángulo de texturas para clasificación de suelos.	25
Figura 7: Incorporación de las hormonas al biosólido por homogenización en rotavapor.	28
Figura 8: Bioensayos de plantas de trigo.	29
Figura 9: Plántulas de trigo tras 28 días de ser sembradas.	29
Figura 10: Subproductos de la derivatización de EE2 con MSTFA.	38
Figura 11: Di-TMS-EE2. Producto único en la derivatización con MSTFA y piridina 1:1 (v/v).	38
Figura 12: Señal cromatográfica de EE2, derivatizada con MSTFA/piridina (1:1).	39
Figura 13: Señal cromatográfica de EE2, derivatizada con MSTFA.	39
Figura 14: Trimetilsililestrona TMS E1.	41
Figura 15: (bi) Trimetilsililestradiol TMS E2.	40
Figura 16: (bi) Trimetilsilil etinil estradiol TMS EE2.	41

Figura 17: Concentración de hormonas encontradas en las raíces y parte aérea de las plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólido enriquecido con hormonas.	43
Figura 18: Comparación del contenido de hormonas en plantas de trigo y el método biosimulador de ciclodextrina en el suelo Chicauma tratado con biosólido enriquecido.	47
Figura 19: Comparación del contenido de hormonas en plantas de trigo y el método biosimulador de ciclodextrina en el suelo Lo Prado tratado con biosólido enriquecido.	47
Figura 20: Biodisponibilidad de EE2 en la planta de trigo comparada con la extracción con ciclodextrina en los suelos tratados con biosólido natural.....	48
Figura 21: Biomasa de las plantas de trigo cultivadas en los suelos Chicauma y Lo Prado tratados con 90 Mgha ⁻¹ de biosólido.	50
Figura 22: Actividad microbiana en el suelo Chicauma con y sin enriquecimiento de hormonas.	52
Figura 23: Actividad microbiana en el suelo Lo Prado con y sin enriquecimiento de hormonas.	53
Figura 24: Nitrato y Amonio en suelos tratados con y sin enriquecimiento de hormonas.	54
Figura 25: Señal cromatográfica de E1 derivatizada con MSTFA/piridina (1:1).....	63
Figura 26: Señal cromatográfica de E1 derivatizada con MSTFA.	63
Figura 27: Señal cromatográfica de E2 derivatizada con MSTFA/piridina (1:1).....	64
Figura 28: Señal cromatográfica de E2 derivatizada con MSTFA.	64

RESUMEN

La recuperación de un suelo para uso agronómico se ha acentuado en las últimas décadas debido a la alta demanda alimenticia que busca solventar la producción agrícola. Dependiendo del uso y de las condiciones climáticas, un suelo puede ver amenazada su resiliencia y su capacidad depurativa, lo que a largo plazo puede derivar en la alteración de sus componentes fisicoquímicos y biológicos dejándolo en calidad de suelo degradado. Para revertir esta condición, se han implementado tecnologías que incluyen fertilizantes y abonos que le entregan los nutrientes y minerales al suelo que son necesarios para las plantas.

En el contexto de generar soluciones viables y sustentables, el SAG permite el uso de lodos estabilizados para la recuperación de suelos agrícolas.

Tanto los efluentes como los biosólidos de las plantas de tratamiento de aguas servidas, transportan una serie de contaminantes que provienen de actividades antrópicas. A estos contaminantes se les conoce como contaminantes emergentes, y hasta ahora no han sido considerados en las normativas. Mientras tanto, su estudio busca evaluar el nivel de riesgo y peligrosidad que representan para el ser humano y el medio ambiente.

Los contaminantes emergentes pueden circular en distintos ecosistemas, incorporándose a cadenas tróficas en medios terrestres y acuáticos. En algunos seres vivos ha quedado de manifiesto el efecto que generan algunos contaminantes en su sistema endocrino, es por ello que se les conoce con el nombre de Compuestos Disruptores Endocrinos (CDE).

Las hormonas estrogénicas revisten un potencial peligro de disrupción endocrina, debido a su álgida actividad biológica. En este trabajo se priorizó el estudio de las hormonas estrogénicas: estrona (E1), 17β -estradiol (E2) y de 17α -etinilestradiol (EE2), cuyo objetivo principal fue evaluar la presencia y biodisponibilidad de cada una de ellas en suelos cultivados con plantas de trigo, y comparar los resultados con un método biosimulador con ciclodextrina.

Mediante extracción asistida por ultrasonido (US), etapa de limpieza con extracción en fase sólida (SPE) y determinación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS), se encontró $150,10 \pm 6,40 \mu\text{gkg}^{-1}$ de EE2 en el biosólido de una planta de tratamiento.

Para evaluar el eventual riesgo que conlleva el uso de enmiendas orgánicas para la restauración de suelos, se montó un bioensayo con plantas de trigo simulando condiciones naturales de riego y climatización. Los suelos fueron tratados con biosólido en razón de 90 Mgha^{-1} , y además se incluyeron suelos tratados con biosólido enriquecido con 10 mgkg^{-1} de las hormonas E1, E2 y EE2.

Tras analizar las plantas, fue posible conocer la biodisponibilidad de cada hormona en el suelo. Se pudo constatar una alta tasa de degradación de E1, ya que no se encontró ni en las raíces ni en la parte aérea. Las otras dos hormonas, mostraron un comportamiento distinto para cada suelo. Se encontraron factores de bioconcentración (FBC) de 0,01 para E2 y de 0,54 para EE2 en el suelo Lo Prado, tratado con biosólido enriquecido, mientras que el suelo Chicauma, tratado con biosólido enriquecido, presentó FBC de 0,15 y 0,7 para E2 y EE2, respectivamente. En el suelo tratado con biosólido natural solo se encontró EE2 en las raíces de las plantas cultivadas en ambos suelos.

Para validar el método biosimulador con ciclodextrina, fue necesario correlacionar los valores obtenidos en la extracción de hormonas con hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPDC) con los de la fracción biodisponible en plantas de trigo mediante un test de correlación lineal simple. Los resultados fueron comparables, ya que se encontraron parámetros estadísticos admisibles, $p\text{-value} \leq 0,05$ y $r = 0,99$. Por lo tanto, se validó la metodología con respecto a los bioensayos de plantas de trigo. Además, se encontró que la presencia de hormonas no influye mayormente sobre la actividad microbiana en los suelos. Esto se demostró mediante de la determinación de CO_2 , N-NO_3^- y N-NH_4^+ .

SUMMARY

The soil restoration for agricultural use has increased in recent decades due to high food demand, which agricultural production seeks to solve. Depending on use and climatic conditions, a soil's resilience and purification capacity can be threatened, which could lead to a long-term alteration of its physico-chemical and biological components leaving it in the condition of degraded soil. Technologies have been implemented in order to reverse this condition, including fertilizers and manure that deliver nutrients and minerals necessary for plants to the soil.

In the context of creating viable and sustainable solutions, SAG allows the use of stabilized sludge for soil restoration for agricultural use.

Both effluents and biosolids from wastewater treatment plants carry a number of pollutants from human activities. These pollutants are known as emerging contaminants, which haven't been considered in the regulations. Meanwhile, their study aims to assess the level of risk and danger posed to humans and the environment.

Emerging contaminants can circulate in different ecosystems, incorporating themselves to food chains in terrestrial and aquatic environments. In some living organisms, it has been revealed the effect generated by some pollutants in their endocrine system, which is why they are known as Endocrine Disrupting Compounds (EDC).

Estrogenic hormones are of potential danger of endocrine disruption, because of its outstanding biological activity. The study of estrogenic hormones are prioritized in this research: estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2), whose main objective was to evaluate the presence and bioavailability of each one in soils cultivated with wheat plants and to compare the results with a cyclodextrin biosimulator method.

Through ultrasound assisted extraction (US), solid phase extraction (SPE) and gas chromatography coupled to mass spectrometry determination (GC/MS), $150.10 \pm 6.40 \mu\text{gkg}^{-1}$ of EE2 were found in biosolid from a treatment plant.

To assess the potential risk associated with the use of organic amendments for soil restoration, a bioassay with wheat plants was mounted simulating natural conditions of irrigation and air conditioning. Soils were treated with 90 Mg of biosolid per hectare. Soils treated with biosolids, spiked with 10 mgkg⁻¹ of the E1, E2 and EE2 hormones, were also included.

After analyzing the plants, it was possible to know the bioavailability of each hormone in the soil. It was found a high degradation rate of E1, due to its absence in both roots and upper part. The others two hormones showed a different behavior in each soil. Bioconcentration factor (BCF) of 0.01 for E2 and 0.54 for EE2 were found on the soil Lo Prado, treated with spiked biosolid, while the soil Chicauma, treated with spiked biosolid, presented BCF 0.15 and 0.7 respectively. In soil treated with natural biosolid, EE2 was only found in roots.

In order to validate the cyclodextrin biosimulator method, it was necessary to correlate the values obtained in the extraction of hormones with β -hydroxypropyl-cyclodextrin (HPCD) with the bioavailable fraction in wheat plants, using a simple linear correlation test. The results were comparable with admissible statistical parameters, p-value ≤ 0.05 and $r = 0.99$. Therefore, the methodology was validated with respect to wheat plants bioassays. In addition, it was found that the presence of hormones don't influence the microbial activity in the soil. This was demonstrated by the determination of CO₂, N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺.

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes Generales.

1.1.1 Tratamiento de aguas servidas.

El manejo sustentable de los recursos naturales implica descontaminar, reutilizar y recuperar desechos de distintos procesos que pudiesen ser útiles en algún área de producción. No obstante, la calidad de estos desechos debe ser estudiada previamente al uso que se le quiera dar. Así por ejemplo las aguas residuales al ser tratadas, pueden ser utilizadas como agua de riego (Criterios de calidad de aguas o efluentes tratados para uso en riego, SAG, 2005).

En la Región Metropolitana existe un total de 30 plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS), entre ellas figuran: El Trebal, La Farfana, San José de Maipo, Talagante, Valdivia de Paine (pertenecientes a la empresa Aguas Andinas S.A.), Los Trapenses (Aguas Manquehue S.A.), Lomas de Lo Aguirre (EMAPAL S.A.), Las Higueras (SEMBCORP Aguas Lampa S.A.), entre otras (<http://www.siss.cl/577/w3-article-5059.html>). Con todas las plantas operativas, es posible tener una cobertura de cerca del 100% del tratamiento de las aguas servidas provenientes de la cuenca Santiaguina. En el último tiempo, el proyecto Mapocho Urbano Limpio y el Plan de Saneamiento de las Aguas Servidas de la Región Metropolitana ha buscado reducir el impacto que genera el vertimiento de efluentes en cuerpos de agua como ríos o lagos, lo que no ha estado exento de externalidades como la generación de 290 mil toneladas de lodo por cada año (Aguas Andinas, 2013).

1.1.2 Tratamiento de lodos y obtención de biosólidos.

La operación de plantas de tratamiento de aguas servidas, parte con la entrada de agua cruda a una etapa de pretratamiento que consiste en la separación de los sólidos mediante el cribado por tamices de distinto tamaño. Posteriormente, los sólidos más pequeños se separan por sedimentación en el tratamiento primario, que conlleva a la formación de lodos primarios que pasan directo al tratamiento de lodos. El agua

recuperada del tratamiento primario ingresa a un tratamiento secundario o tratamiento biológico en el cual se vuelven a separar los sólidos que constituyen los lodos secundarios, los que son llevados junto con los primarios a la línea de tratamiento de lodos para ser tamizados y espesados gravitacionalmente. La mezcla es bombeada hacia reactores anaeróbicos para su estabilización biológica, procesos destinados a mitigar el potencial de atracción de vectores sanitarios y agentes patógenos. Luego, los lodos digeridos son deshidratados mediante centrifugación, cuyo resultado son los biosólidos.

Una vez que los sólidos volátiles se reducen en un 38% como mínimo, se habla de lodos estabilizados (D.S N°004/2009).

1.1.3 Legislación en gestión de los biosólidos.

Surge aquí una problemática medioambiental con un evidente riesgo de contaminación dada la creciente acumulación de biosólido en las plantas de tratamiento. Sumado a ello, las empresas deben gestionar sus residuos en base a lo que establece el Artículo 12° del D.S N°004: “Sólo se permitirá el almacenamiento en la planta de tratamiento de aguas servidas de lodos estabilizados en cantidades inferiores a 40 toneladas y por un plazo máximo de siete días”.

Una solución viable para este problema ha sido la aplicación de biosólido a suelos degradados. Se entiende por suelo degradado a aquel que, por exceso de acidez y de sales, niveles de erosión, deterioro de la cubierta vegetal o que, por presentar otras limitaciones físicas, químicas o estructurales, no puede ser utilizado de modo sustentable en la producción agrícola. Para decretar esta condición y revertirla, es preciso conocer el contenido de metales como As, Cd, Zn, Cu, Hg, Ni, Pb y Se, pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, entre otros parámetros, tanto del biosólido como del suelo receptor (D.S N°004/2009).

Tabla 1. Concentraciones máximas de metales pesados en suelo receptor y biosólido.

Metales	Concentración máxima en mgkg ⁻¹ suelo (en base materia seca)			Concentración máxima en mgkg ⁻¹ biosólido para suelos degradados
	Macrozona norte		Macrozona sur	
	pH > 6,5	pH ≤ 6,5	pH > 5	
Arsénico	20	12,5	20	40
Cadmio	2	1,25	2	40
Cobre	150	100	75	1200
Mercurio	1,5	1	1	20
Níquel	112	50	30	420
Plomo	75	50	50	400
Selenio	4	3	4	100
Zinc	175	120	175	2800

Para aquellos suelos que cumplen con los requisitos de la Tabla 1, la tasa máxima de aplicación de biosólido permitida es de 90 Tonha⁻¹ por año (base materia seca). En aquellos suelos que excedan los límites establecidos para metales pesados, y que no hayan sido receptores de lodo previamente, se les permitirá una tasa máxima de aplicación de 30 Tonha⁻¹ por año (D.S N°004/2009).

La aplicación de biosólido a suelos degradados surge en respuesta a la necesidad de recuperación de suelos para uso agrícola, que busca solventar la demanda de alimentos de una población que crece considerablemente cada año. Teniendo en cuenta el aporte de nutrientes, nitrógeno y fósforo a un suelo desprovisto de materia orgánica, es una medida que podría traer ventajas económicas y fomentar el desarrollo de la producción agrícola. En este contexto, cobra relevancia estudiar el contenido de contaminantes en los lodos y comprender cómo interactúan con el suelo, si existe o no transferencia de ellos a los seres vivos y que tan peligrosos son para la salud humana.

1.1.4 Contaminantes Emergentes y su efecto en la salud.

Hoy en día, el uso masivo e indiscriminado de productos químicos en alimentos, medicamentos, productos de aseo, y otros, han dejado su huella en el medio ambiente. Particularmente en biosólidos, estiércol y en aguas residuales, se han encontrado una serie de contaminantes cuyo efecto no se ha esclarecido del todo y por ende no existe normativa al respecto. Ellos se agrupan en la categoría de contaminantes emergentes (Proser & Sibley, 2014).

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o sus posibles consecuencias, han pasado en gran parte inadvertidas. Esto se debe a que su efecto en el medio ambiente ha tardado en quedar en evidencia, lo que sugiere que una acumulación de estos contaminantes, a lo largo del tiempo, puede ser un riesgo para el ecosistema (Gil y col., 2012).

Dentro de esta categoría de contaminantes, están contemplados compuestos orgánicos cuyo origen es principalmente antropogénico, ya que provienen de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), donde se incluyen antibióticos, antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, hormonas sintéticas y biogénicas, medicamentos veterinarios, entre otros. Compuestos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilospoliclorados (PCBs), dioxinas y furanos (PCDD/F), compuestos orgánicos volátiles (VOCs) compuestos halogenados alifáticos, fenoles, hormonas sexuales esteroideas, son considerados contaminantes emergentes y su peligrosidad, hoy en día, es objeto de estudio en múltiples ramas de la ciencia (Karnjanapiboonwong y col., 2011).

Aunque las concentraciones ambientales de contaminantes emergentes son, por lo general, a nivel de trazas (ngL^{-1} a mgL^{-1}), esto puede ser suficiente para inducir alteraciones en algunos seres vivos (Azzouz & Ballesteros, 2012). El efecto y la persistencia de estos contaminantes, dependen de múltiples factores, como su naturaleza química, concentración y de la matriz en que se encuentran (suelo, agua, atmósfera o matriz biológica) (Epstein, 2003).

Si bien hasta el momento, no se han informado efectos agudos a la salud humana por alguno de estos contaminantes incorporados a través de relaciones tróficas, gran parte de ellos han llegado a entorpecer el normal funcionamiento del sistema endocrino en algunos organismos a lo largo de su vida. Es por esta razón, que se les ha dado la clasificación de Compuestos Disruptores Endocrinos (CDEs) (Silva y col., 2012).

La comunidad científica ha impulsado diversas investigaciones al respecto, atribuyéndole importancia de carácter público por los efectos colaterales que ya son perceptibles en el medio ambiente. Una definición precisa de disruptor endocrino fue propuesta por la Comunidad Europea:

“Un disruptor endocrino es una sustancia exógena que causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, o su progenie, por consiguiente, cambios en las funciones endocrinas” (Flores, 2010).

1.1.4.1 Hormonas esteroideas estrogénicas.

Las hormonas esteroideas son un grupo de compuestos biológicamente activo, que se sintetizan a partir del colesterol. Los esteroides naturales son secretados por la corteza suprarrenal, testículos, ovario y la placenta en humanos y animales, e incluyen progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y los estrógenos (17 β -estradiol, estrona y estriol). También están las hormonas esteroideas sintéticas tales como 17 α -etinilestradiol (EE2) y mestranol (MeEE2), utilizados como anticonceptivos (Guang-Guo y col., 2002)

En los seres humanos y en los animales mamíferos, los estrógenos se someten a diversas transformaciones principalmente en el hígado. Ellos se oxidan con frecuencia, por ejemplo, el 17 β -estradiol (E2) se oxida rápidamente a estrona (E1), que se puede convertir adicionalmente en estriol (E3), que es el principal producto de excreción (figura 1). Muchos otros metabolitos polares como el 16-hidroxi-estrona, 16-cetoestrona o 16-epiestriol pueden estar presente en la orina y heces (Guang-Guo y col., 2002).

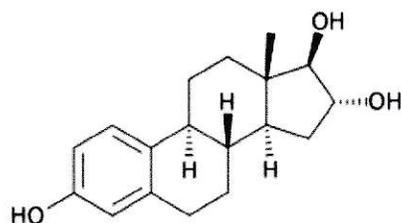


Figura 1. Estructura molecular del estriol (E3), principal producto de excreción en animales.

Los estrógenos que se encuentran en mayor concentración en los residuos de plantas de tratamiento son: la estrona (E1; 3-hydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,13,14,15,16- decahydrocyclopenta[a]phenanthren- 17-ona), el 17 β -estradiol (E2; (17 β)-estra-1, 3, (10)-trieno-3,17-diol) y el 17 α -etinilestradiol (EE2; 17-etinil-13-metil-7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantreno-3,17-diol). Todos ellos se destacan por un alto potencial de disrupción endocrina (Lucas & Jones, 2006).

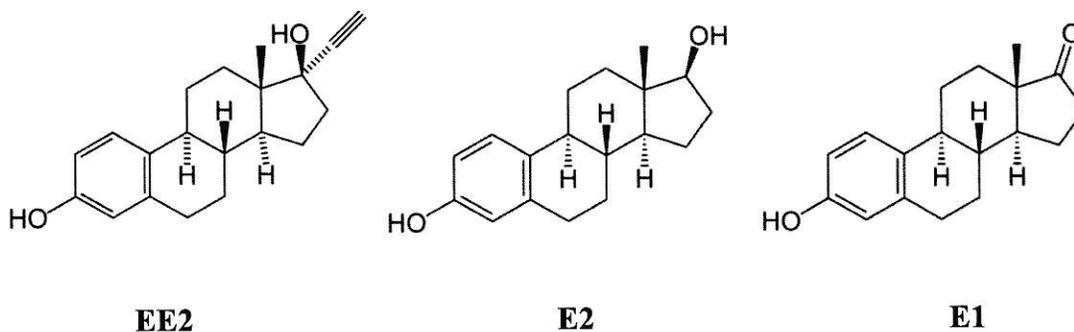


Figura 2: Estructura molecular de 17 α -etinilestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2) y estrona (E1).

Como se puede observar en la figura 2, las hormonas esteroideas tienen un anillo de ciclopentano-o-perhidrofenantreno en común. E1 se diferencia de E2 por un grupo cetona en lugar de un hidroxilo y EE2 se diferencia de E2 por presentar un grupo etinil en el mismo carbono que sostiene un grupo hidroxilo.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las hormonas estrogénicas.

Hormona	Masa molar (g^{mol}⁻¹)	Log K_{ow}	Solubilidad en agua a 20°C (mgL⁻¹)	pK_a	Presión de vapor (mm de Hg)
Estrona (E1)	270,40	3,43	13,00	10,20	2,30*10 ⁻¹⁰
17β-estradiol (E2)	272,40	3,94	13,00	10,27	2,30*10 ⁻¹⁰
17 α-etinil estradiol (EE2)	296,40	4,15	4,80	10,24	4,50*10 ⁻¹¹

En base a la información que se presenta en la Tabla 2, es posible sostener que las hormonas presentan una baja solubilidad en agua, siendo EE2 menos soluble que E1 y que E2, esto puede explicarse por el grupo etinil, que dificulta la formación de puentes de hidrógeno con el grupo OH reduciendo significativamente su solubilidad. Por su parte el K_{ow} reafirma lo dicho anteriormente, puesto que EE2 es el que presenta el valor más alto de coeficiente de partición octanol-agua, aludiendo a su carácter lipofílico.

El anillo aromático que poseen estas moléculas, les confiere cierto grado de acidez que se ve reflejado en un valor de pK_a relativamente bajo.

Por otra parte, la presión de vapor tan baja para estas moléculas, hace alusión a su baja volatilidad. Esto explica que las hormonas, en el medio ambiente, no constituyan un problema a nivel atmosférico, puesto que solo se encuentran en aguas y suelos.

1.1.5 Impacto ambiental de estrógenos presentes en cuerpos de agua.

Diversos estudios han dejado en evidencia que las hormonas estrogénicas circulan desde los efluentes de las plantas de tratamientos a cuerpos de agua donde habitan distintas especies susceptibles a sufrir algún tipo de daño.

Se ha demostrado que la exposición de machos de truchas a estrógenos, provenientes de efluentes de plantas de tratamiento, condujo a la producción de

vitelogenina, una proteína de la yema de huevo característica de hembras, lo que derivó en la feminización de los machos e inhibición de su capacidad reproductiva. Hansen y col. (1998), corroboraron esta hipótesis mediante la inducción de vitelogenina por inyección de 17β -estradiol ($10 \mu\text{gL}^{-1}$) o simulando la exposición *in situ* por descarga de efluentes durante un año. La vitelogenina, en este caso, corresponde al biomarcador de daños endocrinos, que eventualmente explicaría la sobrepoblación de hembras de truchas en las vías navegables de Berlín. Por su parte, Purdom y col. (1994), examinaron la misma proteína en truchas arcoíris, atribuyendo la alta presencia de truchas hermafroditas a una sobreexposición de 17α -etinilestradiol, donde los efectos se manifestaron a concentraciones de 1 ngL^{-1} (Hansen y col., 1998; Purdom y col., 1994).

El potencial disruptor endocrino de EE2 se ha reportado en diversos estudios con invertebrados acuáticos. El test de toxicidad crónica (25 días de exposición) llevado a cabo en *Daphnia magna* por Goto y Hiromi (2003), determinó que una concentración superior a 100 ngL^{-1} de EE2 redujo en un 75% el número de crías. Gross y col. (2001), observaron anomalías en el desarrollo sexual del anfípodo *Gammarus pulex* capturado en áreas próximas a plantas de tratamiento de aguas residuales en Inglaterra, atribuidos principalmente al hallazgo de hormonas estrogénicas y otros xenobióticos que obstruyen receptores responsables de la muda en los machos. Otros ensayos de ecotoxicidad desarrollados por Segner y col. (2003), evidenciaron disturbios y retrasos en la eclosión de los huevos de caracoles de agua dulce, *Limnea stagnalis*, a concentraciones de $0,5\text{-}10 \mu\text{gL}^{-1}$ de EE2. El mismo autor investigó el efecto de esta hormona y de xenoestrógenos como bifenol A (BPA) y octilfenol (OP) en peces cebra, obteniendo como resultados anomalías en el desarrollo de las gónadas y en los niveles de vitelogenina.

Por otro lado, en algunos estudios se ha encontrado que la alfalfa regada con aguas residuales, que contenían hormonas esteroideas, presentó una elevada concentración de fitoestrógenos (Guang-Guo y col., 2002).

Las consecuencias en la vida silvestre y para la salud humana se proyectan a largo plazo, ocasionando principalmente problemas reproductivos en las distintas especies (Guang-Guo y col., 2002).

1.1.6 Estrógenos en suelos agrícolas.

Las hormonas estrogénicas, al ser compuestos lipofílicos, tienden a abandonar las aguas de los efluentes y adherirse al biosólido, a suelos o sedimentos mediante interacciones con la materia orgánica, permaneciendo ocluidas hasta sufrir algún tipo de degradación microbiana o fotolítica, mineralización, absorción por las plantas, lixiviación a la napa freática o transportarse por escorrentía (Lucas, 2006). De todos estos posibles escenarios cobra relevancia la sorción de estos compuestos en la fase sólida del suelo, ya que podría generar un efecto amortiguador de daños en medios acuáticos, o un eventual riesgo si se habla de suelos cultivables (Karnjanapiboonwon y col., 2010).

Azzouz y Ballesteros (2011), encontraron una serie de contaminantes asociados a PPCPs y hormonas en suelos de uso agrícola en Andalucía, España. El análisis de las muestras entregó los siguientes resultados: $51 \pm 3 \text{ ngkg}^{-1}$ de E1, $90 \pm 6 \text{ ngkg}^{-1}$ de E2 y $350 \pm 20 \text{ ngkg}^{-1}$ de EE2. Este hallazgo resulta decidor si se relacionan las propiedades químicas de los compuestos con las concentraciones reportadas, ya que en sedimentos de ríos y biosólido, el patrón fue el mismo, siendo EE2 la que se encontraba en mayor concentración. Esto puede deberse a que es una molécula sintética, lo que explica que sea menos susceptible a transformaciones químicas, sumado a su baja solubilidad en agua, lo que promueve su permanencia en matrices con abundante materia orgánica.

Actualmente, en Chile, los anticonceptivos orales (ACO), constituyen un método de control de natalidad altamente eficaz. Su uso se ha masificado de tal manera que en el año 2014 se posicionaron como la clase terapéutica con mayor porcentaje de ventas con un 6,2%. En el año siguiente, la tendencia fue similar con un porcentaje de ventas de un 6,4% (El mercado de medicamentos en Chile, División de Estudios, Ministerio de Salud, 2013). Esto entregaría una visión general acerca de la dinámica de las hormonas sintéticas y su deposición final en los biosólidos de las plantas de tratamiento.

1.1.6.1 Degradación de estrógenos en suelos.

Las reacciones químicas que sufren las hormonas en el biosólido y en el suelo, han sido el principal objetivo de diversos estudios. En experimentos con lodos activados, prácticamente la totalidad de E2 fue oxidado a E1 en condiciones anaeróbicas, mientras que en condiciones aeróbicas entre el 70 y 80% de E2 fue mineralizado a CO₂ dentro de 24 horas, en tanto la mineralización de EE2 fue 25 a 75 veces menor. En el mismo estudio, se encontró que la vida media del 17β-estradiol en sedimentos de agua dulce puede variar de 5 a 10 días, mientras que en el suelo se reduce a 1 día, siendo E1 el principal producto de degradación. En muestras de agua de ríos de Inglaterra ha quedado demostrada la actividad de microorganismos en la transformación de E2 en E1, éste último con una vida media de entre 0,2 a 9 días incubado a 20°C. En experimentos aeróbicos y anaeróbicos, EE2 experimentó una mayor resistencia a la actividad microbiana que las otras dos hormonas, y su vida media en el suelo fue de 7,7 días, expuesto a 4 °C, mientras que a 30 °C fue de 3 días (Guang-Guo y col., 2002).

1.2 Antecedentes Específicos.

1.2.1 Técnicas cromatográficas para detectar estrógenos en matrices ambientales.

El estudio de la presencia de estos compuestos en efluentes, biosólidos y suelos, requiere de técnicas analíticas que permitan su determinación en concentraciones muy bajas. La determinación de contaminantes en el medio ambiente, usualmente, es llevada a cabo mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UHPLC). Cualquiera de estos sistemas ofrece la separación de los componentes de una mezcla, a través de una columna cromatográfica.

1.2.1.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS).

La cromatografía gaseosa utiliza columnas capilares y una fase móvil gaseosa que debe ser un gas inerte He, Ar, N₂, H₂, de tal manera que transporte los analitos a lo largo de la columna sin interactuar químicamente con ellos. El detector de masas más simple, para cromatografía de gases, es el de trampa de iones (ITD). En este instrumento los iones se generan por impacto de electrones (EI) o por ionización química a partir de la muestra eluida y luego se mantienen en un campo de radiofrecuencia. Los iones atrapados son llevados a una zona de almacenamiento, donde su liberación está sujeta a un barrido en función de la relación masa/carga (m/z) (Skoog y col., 2001). El detector cuadrupolo o filtro de masas opera con un principio similar, donde los iones de diferentes masas (m/z) se separan con la ayuda de un campo eléctrico aplicado, en un espacio confinado por cuatro barras metálicas paralelas, a las cuales se les aplican las corrientes directas (DC) y alterna (radiofrecuencia, RF) (Stashenko y Martínez, 2010).

La determinación analítica de hormonas mediante GC/MS, integra la derivatización de los compuestos de baja volatilidad. La derivatización consiste en transformar la estructura molecular del analito en otra que sea volátil y termoestable, lo que favorece la sensibilidad, separación cromatográfica y simetría de la señal. Para este propósito, se utilizan agentes sililantes, como N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) o N-tert-butil-dimetilsilil-N metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) (Zhang & Zuo, 2005).

1.2.1.2 Extracción de compuestos orgánicos desde la matriz.

El estudio de contaminantes emergentes, ha sido un desafío para la comunidad científica, puesto que se debe ahondar en las interacciones fisicoquímicas de la molécula con matrices naturales y cómo disolver esa interacción para obtener un buen rendimiento de extracción, sin perjudicar la integridad de la molécula. Para ello, existen diversos métodos: extracción sólido-líquido (SLE), extracción acelerada de disolventes (ASE), extracción asistida por ultrasonido (US), extracción con líquido presurizado (PLE), disco rotatorio (RDSE), extracción asistida por microondas (MAE), entre otras (Wu y col., 2015). Cada uno de ellos, debe su aplicación al tipo de analito y de matriz.

1.2.1.3 Eliminación de Interferentes (“clean up”).

Posterior a la extracción, resulta necesario añadir un paso de eliminación de interferentes, como por ejemplo la extracción en fase sólida (SPE) o “clean up”, cuya fase adsorbente retiene los analitos gracias a un acondicionamiento previo que activa la superficie de contacto, permitiendo así, una elusión más específica de los compuestos, lo que favorece su lectura en equipos de alta sensibilidad como GC/MS.

Para compuestos de polaridad intermedia o que presenten en su estructura grupos polares y apolares, es conveniente utilizar Catridge Oasis HLB, como método de “clean up”. Éste consiste en una fase sorbente compuesta por un copolímero que contiene un grupo N-vinilpirrolidona, que posee un carácter hidrofílico, que retiene la parte polar del analito, y un grupo divinilbenceno, el que tiende a retener la parte hidrofóbica o apolar del compuesto. Esta interacción es fácil de disociar con el solvente adecuado, siendo una buena alternativa de limpieza para extractos. En la literatura se han informado buenos porcentajes de recuperación para contaminantes emergentes, lo que contribuye a su cuantificación en pequeñas concentraciones (Ngoc & col, 2013; Shaogan, 2007).

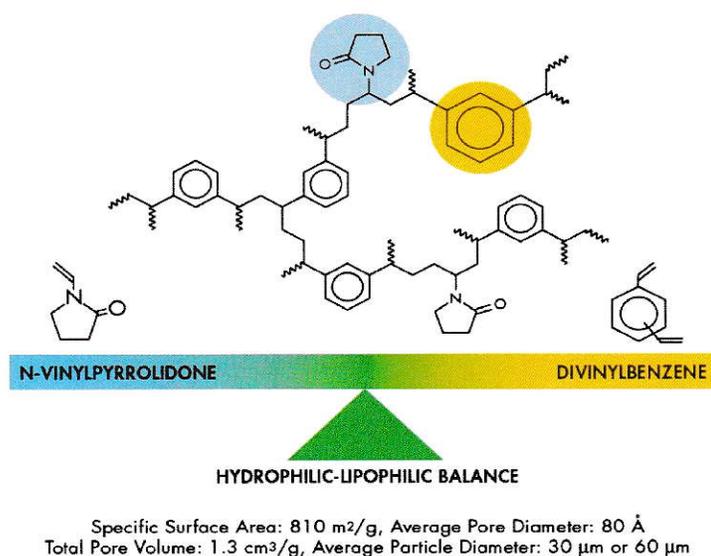


Figura 3: Estructura química de la fase sorbente Oasis HLB.

1.2.2 Biodisponibilidad de contaminantes en suelos agrícolas enmendados con biosólidos.

La finalidad que tiene este tipo de estudios es evaluar la probabilidad de riesgo de contaminación por la aplicación de biosólido en suelos de uso agrícola. Al examinar la presencia y destino de los contaminantes, es posible determinar si constituye o no un peligro para actividades agrícolas. En este ámbito, es preciso diagnosticar la calidad de los alimentos que crecen en suelos restaurados y constatar en qué concentración un determinado compuesto, o sus productos de degradación, son un riesgo para la salud humana. Cuando un determinado contaminante es encontrado en el tejido de un organismo, se dice que está biodisponible y es probable que pueda ocasionar daños.

La biodisponibilidad de un compuesto o elemento, corresponde a la fracción de ellos que es absorbida y asimilada por un receptor biológico. Para determinar con exactitud la biodisponibilidad de un contaminante, es usual desarrollar bioensayos específicos para cada especie y en distintas dosis de exposición. De este modo, es posible observar un rango de tolerancia y así evitar la bioacumulación de sustancias peligrosas en los seres vivos.

Como ya se mencionó, las hormonas en contacto con el suelo, pueden sufrir diversas transformaciones abióticas y bióticas, las que van a repercutir directamente en su capacidad para incorporarse a un sistema vivo. Si al momento de realizar siembras en un suelo previamente enmendado con biosólido, presenta concentraciones traza de hormonas, es importante conocer qué fracción de ellas sería absorbida por las raíces de las plantas. Cabe mencionar, que para que exista absorción, las hormonas deben formar parte de una solución en el suelo que fluye a través de las raíces. En este proceso la solubilidad de los compuestos es fundamental, ya que la absorción de ellos por parte de las plantas, compite con la adsorción de los mismos en la superficie activa de la arcilla y en la materia orgánica del suelo. La mejor forma de probar esta dinámica es con bioensayos de plantas cultivadas en suelos restaurados con biosólido, que simulen condiciones naturales de riego y climatización.



1.2.2.1 Uso de ciclodextrinas como Biosimuladores para estudios de biodisponibilidad.

Para prescindir de los bioensayos, que muchas veces resultan costosos y tardan mucho tiempo, es que se busca validar un método biosimulador que correlacione los valores de concentración encontrados en una planta con el que entrega la nueva metodología. Un compuesto adecuado para estos análisis es la ciclodextrina.

Las ciclodextrinas comprenden una familia de oligosacáridos cíclicos obtenidos del almidón por degradación enzimática. Son ampliamente utilizadas en la industria química y alimentaria. Las más conocidas son α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, las que se diferencian principalmente por el diámetro de la concavidad hidrofóbica y el número de unidades de glucopiranososa que la constituyen, siendo seis para la α -CD, siete para la β -CD y ocho para la γ -CD. En consecuencia, se ha demostrado que la β -CD es la que ofrece mayor estabilidad y rigidez estructural, dado que los grupos OH de los carbonos 2 y 3 (hidroxilos secundarios) tienden a formar puentes de hidrógeno intramoleculares con las unidades de glucosa adyacentes. Debido a esto, su configuración no se ve afectada en la formación de complejos. Mientras la α -CD, es recomendada para formar complejos de inclusión con halógenos, alcoholes y moléculas orgánicas alifáticas de baja masa molar, la β -CD es la más idónea para la extracción de heterociclos, fenantrenos, esteroides y en general de moléculas con mayor masa molar (Del Valle, 2003). Por su parte la γ -CD no ha dado mejores resultados que la β -CD en la formación de complejos, debido a que las moléculas huésped al interior del macrociclo se desordenan dada las fuerzas repulsivas que generan las ocho unidades de glucopiranososa de γ -CD. Es por esto, que más de ocho unidades monoméricas han sido descartadas para objetivos de extracción ya que se agudizan las interacciones repulsivas e impedimentos estéricos (Contreras, 2001).

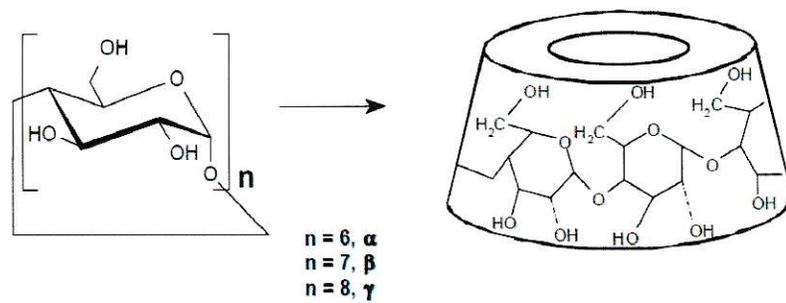


Figura 4: Representación de una ciclodextrina.

En la figura 4, es posible observar que los -OH secundarios apuntan hacia afuera en el borde más grande; los $\text{-CH}_2\text{OH}$ se dirigen hacia afuera en torno al borde menor, por lo que su polimerización deriva en formar una concavidad con centro hidrofóbico.

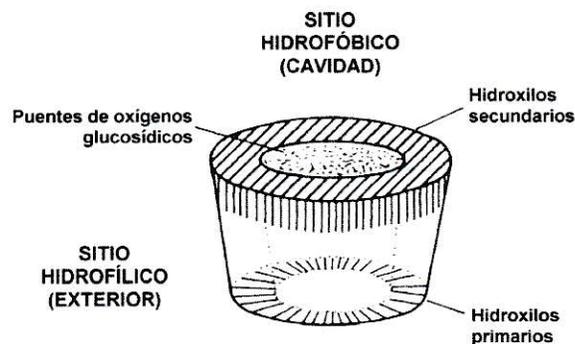


Figura 5: Representación de una ciclodextrina, indicando las regiones hidrofóbicas (cavidad) e hidrofílica (exterior).

Como se aprecia en la estructura de la figura 5, el sustrato queda encapsulado en el interior del macrociclo, proceso que se conoce con el nombre de encapsulamiento molecular, y a la molécula en su interior se le denomina huésped. Dicho complejo de inclusión, ve favorecida su formación justamente por la presencia de agua, que impulsa a las moléculas apolares a entrar en la cavidad de la ciclodextrina. En esta concavidad no se forman ni rompen enlaces covalentes, las interacciones anfitrión-huésped son intermoleculares, como: fuerzas de Van der Waals, entre la naturaleza hidrofóbica de las moléculas huésped y la cavidad lipofílica de la ciclodextrina; puentes de hidrógeno, entre los grupos funcionales polares de las moléculas huésped y los grupos hidroxilo de la

ciclodextrina; fuerzas de dispersión de London e interacción dipolo-dipolo (Contreras, 2001). La fuerza de atracción molecular y cohesión del macrociclo, dependen de su tamaño, polaridad e impedimento estérico de la molécula huésped, como también del tipo de ciclodextrina involucrada (Del Valle, 2003).

Al hablar de formación de complejos, se infiere que es un proceso reversible descrito por una constante de equilibrio, conocida como constante de asociación (K_a). La adición de solventes orgánicos como alcohol o éter reduce considerablemente el valor de K_a , debido a la disminución de la polaridad del medio (Contreras, 2001).

Entre los tipos de β -CD, la hidroxipropil β -ciclodextrina (HPCD) sugiere un modelo biosimulador para contaminantes orgánicos en el suelo. Su rapidez y eficiencia en la formación de complejos puede relacionarse con la transferencia de estos compuestos a la solución del suelo, lo que los convierte en biodisponible para las plantas. En la literatura se ha encontrado que para este tipo de análisis, HPCD ha mostrado mejores resultados que otros agentes tensioactivos iónicos y no iónicos, mientras que la carboximetil- β -ciclodextrina (pCMCD) ofrece un comportamiento parecido al de HPDC, por lo que se sugiere como alternativa (Crampon y col, 2016).

Los parámetros de optimización para esta técnica, incluyen el tiempo de contacto, el tipo de ciclodextrina, la concentración de la solución y, por último, el solvente de extracción con el que se busca disociar la interacción hidrofóbica del macrociclo con la molécula huésped (Wong & Bidleman, 2010).

1.2.3 Propuesta del Seminario

En el presente trabajo se buscan establecer métodos analíticos reproducibles para la determinación de hormonas estrogénicas en suelos restaurados con biosólido. Con ello, esclarecer la probabilidad de riesgo de contaminación de los cultivos en suelos de uso agrícola.

1.3 Hipótesis

La aplicación de biosólido a un suelo, eventualmente podría incorporar estrógenos como E1, E2 y EE2. La concentración biodisponible de las hormonas encontrada en las plantas puede ser correlacionada con un método biosimulador de extracción con ciclodextrina.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar la presencia y biodisponibilidad de las hormonas estrogénicas E1, E2 y EE2 en suelos tratados con biosólido, por medio de bioensayo con plantas de trigo (*Triticum aestivum*) y extracción con ciclodextrina (HPCD).

1.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el suelo, proveniente de dos series de la Región Metropolitana, y el biosólido que se aplicará al suelo.
- Determinar la concentración de las hormonas E1, E2 y EE2 en el biosólido mediante una extracción asistida por ultrasonido y una posterior cuantificación de los analitos por GC/MS.
- Determinar la concentración biodisponible de E1, E2 y EE2 en suelos enmendados con biosólido a través de un bioensayo con plantas de trigo.
- Estimar la concentración biodisponible mediante un método químico de extracción de las hormonas con ciclodextrina, validando la metodología por comparación con los resultados del bioensayo.
- Evaluar la influencia de las hormonas estrogénicas en la actividad microbiana del suelo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

- Acetato de etilo, acetona, metanol, hexano, diclorometano y acetonitrilo grado HPLC, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido sulfúrico (97%), ácido nítrico (65%), ácido clorhídrico (37%) Merck (Darmstadt, Germany).
- Dicromato de Sodio (BiosLab, Chile).
- Hidróxido de Sodio, Merck p.a.
- Agua ultrapura (Milli Q).
- Agente derivatizante, N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Piridina, Merck.p.a.
- Nitrógeno extra puro <99,995%, Linde (Santiago, Chile).
- Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Ácido Bórico Merck p.a
- Ácido glucónico Merck p.a
- Hidróxido de litio monohidratado (LiOH*H₂O), Merck p.a
- Mezcla catalítica Devarda's alloy Merck

2.2 Estándares

- 17 α -etinilestradiol 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Estrona 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- 17 β -estradiol 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Estrona C13, Estándar surrogate de Estrona (3,4-¹³C₂ E1) 90%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (USA).
- PCB 99%, Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Estándar de nitrato (NO₃⁻) 1000 mgL⁻¹, Merck

- Estándar de amonio (NH_4^+) 1000 mgL^{-1} , Titrisol, Merck
- Estándar de cloruro de sodio (NaCl) 1000 mgL^{-1} , Merck
- Estándar de sacarosa S.A 1390
- Estándar multielemento de metales 1000 mgL^{-1} , Merck

2.3 Materiales

- Filtros Millipore 0,20 μm de Membrana de Nylon
- Jeringas hipodérmicas BD Plastipak de 10 mL
- Jeringas de Inyección HAMILTON de 10, 50, 100 y 1000 μL .
- Cartuchos OASIS HLB Waters de 3 cc
- Tubos de vidrio de 50 mL
- Viales ámbar de 2, 10 y 20 mL
- Matraces de aforo de 2, 5, 10, 50 y 100 mL
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de centrifuga
- Portafiltro de MILLEX-HV
- Membrana de PVDF de 0,45 μm de poro
- Tubos eppendorf

2.4 Semillas

- Trigo (*Triticum aestivum*)

2.5 Instrumentos y Equipos

- Balanza analítica Swiss Quality 125 A
- Balanza digital Adam AQT-2600
- Balanza granataria PJ precisa junior 5000
- pH metro WTW pmx 3000
- Conductímetro WTW LF 539
- Centrifuga varifuge 3.0, HeraeusSepatech

- Ultrasonido, Power Sonic 410
- Plancha calefactora Gerhardt
- Agitador Mecánico HEIDOLPH promax 2022
- Agitador Orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC classic C-24
- Espectrofotómetro UV-Visible, Unicam UV/Vis spectrometer
- Espectrómetro Perkin Elmer 1100B
- Hidrómetro ASTM 152 H
- Termómetro BRAND
- Horno microondas Milestone mls 1200 Mega
- Incubadora VWR
- Estufa WTC Binder
- Manifold para SPE SUPELCO visipred
- Rotavapor Heidolf HB Digital
- Liofilizador Bench Top Pro
- HPLC Pump Waters 1515
- Destilador Arquimed modelo UDK 127
- Digestor Arquimed DK 6

2.6 Cromatógrafo GC/MS.

El cromatógrafo de gases es un Thermo Fisher modelo Focus con detector de espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo, ISQ e inyector SSL. El modo de ionización es por impacto electrónico (EI), como gas portador se utilizó helio de 99,999 % de pureza con un flujo de 1 mLmin^{-1} y columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 μm , con un máximo de temperatura a $350 \text{ }^\circ\text{C}$.

El programa de temperaturas utilizado en el horno, se inicia en $75 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto, luego alcanza los $150 \text{ }^\circ\text{C}$ a una razón de $20 \text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$ manteniéndose por 5 min, y finalmente llega a una temperatura de $300 \text{ }^\circ\text{C}$ con una rampa de $10 \text{ }^\circ\text{Cmin}^{-1}$, manteniéndose por 10 minutos con un “solvent delay” de 7 min. La temperatura del inyector utilizada fue de $280 \text{ }^\circ\text{C}$ en modalidad “splitless,” la línea de transferencia a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, la fuente de ionización a $200 \text{ }^\circ\text{C}$, y el flujo del gas portador de 1 mLmin^{-1} .

2.7 Caracterización fisicoquímica de los Suelos y del Biosólido.

Se utilizaron dos suelos de la zona central de Chile pertenecientes a la serie Chicauma (6321,9 Km de latitud UTM y 320,8 Km de longitud UTM) y Lo Prado (6268,2 Km de latitud UTM y 329,1 Km de longitud UTM). Para su recolección se apartó con una pala el nivel superficial y restos orgánicos, y se obtuvieron muestras de 0 a 20 cm de profundidad, las que fueron secadas al aire y tamizadas a un tamaño de 2 mm.

La muestra de biosólido se recolectó de una de las plantas de tratamientos de aguas servidas de la Región Metropolitana (Junio, 2015), luego se secó al aire y se tamizó a 2 mm.

Tanto los suelos, como el biosólido, fueron caracterizados física y químicamente a través de: pH, contenido de carbono orgánico, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, contenido de metales pesados, y solamente al suelo se le determinó la textura.

2.7.1 Determinación de pH.

Se preparó una suspensión de suelo o de biosólido, previamente tamizado (2 mm), con agua en la proporción 1:2,5. La suspensión se agitó vigorosamente durante 5 minutos en agitador recíproco y se dejó reposar por dos horas. La medición del pH se realizó por potenciometría con un electrodo combinado de vidrio-calomelano, previamente calibrado (Sadzawka, 2006).

2.7.2 Determinación de conductividad eléctrica.

La muestra de suelo o de biosólido, se mezcló con agua destilada en una relación 1:5, en un frasco plástico. Se agitó por 30 minutos en agitador recíproco, se filtró con papel filtro N°2 y se colectó el filtrado en un vaso plástico para la medición en el conductímetro. Se corrigió la conductividad a 25 °C (Sadzawka, 2007).

2.7.3 Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

La determinación de la CIC se llevó a cabo mediante una saturación del suelo o biosólido con una solución de acetato de sodio 1 M.

En un tubo de centrifuga se agregó 4 g de suelo junto con 33 mL de una solución de acetato de sodio 1 M a pH 8,2. Se agitó el tubo durante 5 minutos en un agitador mecánico recíproco. Se centrifugó 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se trató la muestra con otras tres porciones más de 33 mL de acetato de sodio 1 M. A continuación, se agregó 33 mL de etanol repitiendo el procedimiento anterior. Por último, se agregaron 3 porciones de 33 mL de acetato de amonio y se colectó el sobrenadante en un matraz de aforo de 100 mL. El extracto se diluyó 50 veces al igual que los blancos.

Se elaboró una curva de calibración desde 1 mgL^{-1} a 20 mgL^{-1} de cloruro de sodio, a partir de un estándar de 1000 mgL^{-1} . Se midió el sodio presente en el extracto por Espectroscopía de Emisión Atómica (EEA), a 589 nm (M.L Jackson, 1970).

2.7.4 Determinación de Carbono Orgánico (CO).

Se pesó entre 1 y 2 g de suelo en triplicado, (si es biosólido la cantidad de muestra no debe superar los 0,1 g) y se colocaron en matraces Erlenmeyer. Se incluyeron dos blancos y seis matraces con 1 mL de una serie de estándares de carbono orgánico (CO) a partir de sacarosa (0 a 50 mg de CO/mL). A cada matraz se le agregó 10 mL de solución de dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 M y 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Luego se dejó reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos. Terminado el tiempo de reposo, se agregó 70 mL de agua Milli-Q y se dejó reposar durante la noche. Una alícuota del sobrenadante de cada matraz fue vertida a una cubeta y se midió el dicromato reducido en el espectrofotómetro UV-Vis a 600 nm (Sadzawka, 2006). La lectura obtenida fue utilizada para obtener el %CO en función de la siguiente fórmula:

$$\%CO = \frac{(a - b) \times 1,16}{10 \times s} \times fh$$

Donde:

%CO; porcentaje de carbono orgánico.

a, mg de CO en la muestra.

b, mg de CO en el blanco.

s, masa de suelo (g).

fh, factor de humedad.

1,16; factor de relación con el método de titulación (Walkey y Black).

La materia orgánica se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Materia orgánica (\%)} = 1,724 \times \%CO$$

Donde:

1,724; factor de conversión.

2.7.5 Determinación de metales pesados.

Alrededor de 200 mg de muestra de suelo o de biosólido fue sometida a una pseudo-digestión con agua regia (ISO 11466). Se incluyeron dos blancos y a cada muestra se agregaron 6 mL de una mezcla concentrada de HCl y HNO₃ 1:3 (v/v), utilizando un horno microondas, Milestone mls 1200 Mega. El programa de digestión se dividió en tres etapas: 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W, luego se sometió a un minuto de ventilación y 30 minutos de reposo en un baño de agua fría. Las muestras digeridas, se transfirieron a matraces de 10 mL, se aforaron con agua Milli-Q y se filtraron con papel filtro N°2. Para determinar la concentración de los metales: Cu, Zn, Pb, Ni, Cr y Cd por espectroscopía de absorción atómica (EAA) con llama (FAAS), se elaboró una curva de calibración a partir de un estándar multielemento (Merck) de 1000 mgL⁻¹, con los puntos: 1; 1,5; 2; 2,5; 4; 5; 7; 9; y 10 mgL⁻¹ (Contreras, 2009).

2.7.6 Determinación de la Textura de los suelos.

La determinación de textura de los suelos, se realizó a través del método del hidrómetro (Bouyoucos) que consistió en pesar 50 gramos de suelo en un frasco plástico de 1 L, luego se agregó 700 mL de agua destilada y 20 mL de solución de hexametáfosfato de sodio al 10%. Se dejó agitando la solución por 15 minutos en el agitador mecánico y se trasvasió a una probeta de 1 L y se enrasó con agua destilada. Se tapó la probeta con parafilm y se agitó manualmente por un minuto. Se dejó en reposo por 4 minutos y se midió la temperatura y la lectura del hidrómetro. Se volvió a medir la temperatura y la lectura del hidrómetro luego de dos horas (Sadzawka, 2007).

Para conocer la textura de los suelos Chicauma y Lo Prado, fue necesario obtener la lectura corregida (H_c), a través de la siguiente expresión:

$$H_{1c} = H_1 + [(T_1^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

Donde:

H_{1c} , corresponde a la lectura corregida del hidrómetro a los 4 minutos.

H_1 , corresponde a la lectura del hidrómetro a los 4 minutos.

T_1 , corresponde a la temperatura en $^{\circ}\text{F}$ registrada a los 4 minutos.

$$H_{2c} = H_2 + [(T_2^{\circ}\text{F} - 67^{\circ}\text{F}) \times 0,2]$$

Donde:

H_{2c} , corresponde a la lectura corregida del hidrómetro luego de dos horas.

H_2 , corresponde a la lectura del hidrómetro luego de dos horas.

T_2 , corresponde a la temperatura en $^{\circ}\text{F}$ registrada luego de dos horas.

Para conocer los porcentajes de Arena, Arcilla y Limo, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Arena} = 100 - (H_{1c} \times 2)$$

$$\% \text{Arcilla} = H_{2c} \times 2$$

$$\% \text{Limo} = 100 - (\% \text{Arcilla} + \% \text{Arena})$$

Luego fue posible encontrar la textura del suelo en el Triángulo de texturas.

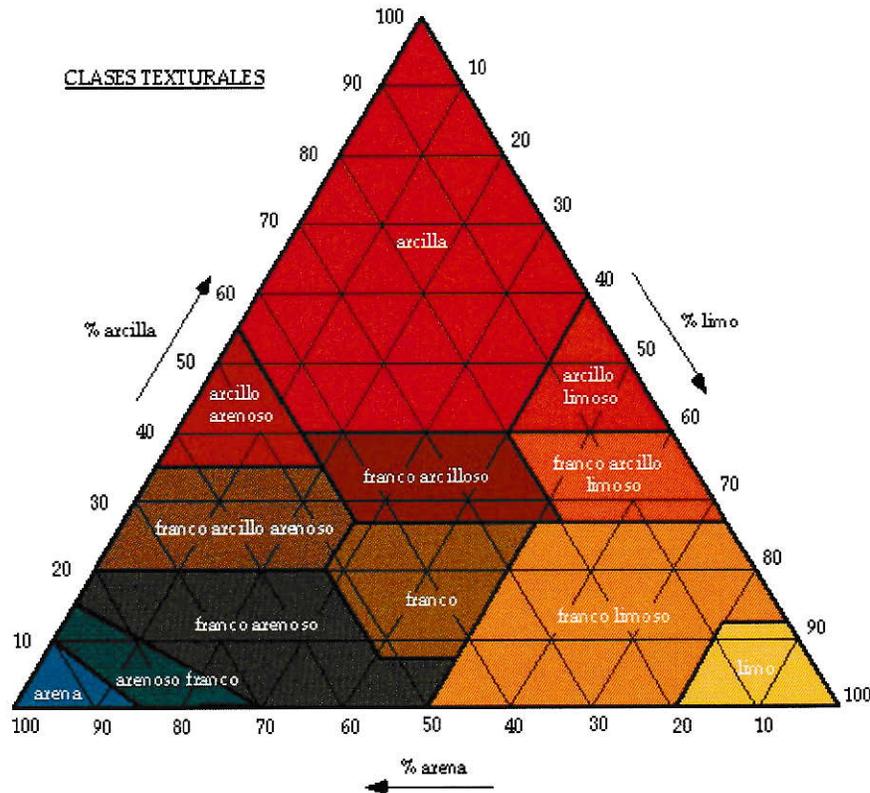


Figura 6: Triángulo de texturas para clasificación de suelos.

2.7.7 Determinación de Nitrógeno total mediante digestión Kjeldahl.

Se pesó 1 g de suelo o biosólido, previamente tamizado (2 mm). Se agregó alrededor de 1 g de mezcla catalítica Devarda y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado en los tubos de digestión. Los tubos se colocaron en el digestor y se programó la digestión a 420 °C por 90 minutos. Se incluyeron 2 blancos. Se esperó que los tubos llegaran a temperatura ambiente y se agregó 40 mL de NaOH 25%, luego la mezcla se destiló por 7 minutos. En un matraz de 150 mL, se agregó 25 mL de ácido bórico-indicador y se colocó bajo el extremo del condensador. Se tituló el contenido del matraz con HCl 0,01 M hasta el viraje de verde a púrpura (Sadzawka, 2006).

El contenido total de nitrógeno se calculó según la siguiente fórmula:

$$N(\%) = \frac{(a - b)}{s} \times M \times 1,4 \times fh$$

Donde:

N(%), porcentaje de nitrógeno.

a, mL de HCl gastados en la muestra.

b, mL de HCl gastados en el blanco.

m, molaridad del HCl.

fh, factor de humedad.

s, peso del suelo (g).

1,4; factor de corrección por peso atómico del nitrógeno.

2.8 Análisis químico.

2.8.1 Identificación de estrógenos mediante GC/MS.

Se realizó un barrido completo (modalidad full scan) de masas en un rango de 50-550 m/z para los analitos E1, E2, EE2, (3,4)¹³C₂ E1 y PCB. Luego se realizó un monitoreo selectivo de iones (SIM), donde se seleccionaron dos iones representativos y de alta abundancia para cada uno de los compuestos. El ion de mayor abundancia se utilizó para cuantificar (target ion) y el segundo para la confirmación inequívoca del analito (qualifier ion). La confirmación del analito se realizó de acuerdo a la razón de la abundancia de ambos iones en la muestra, la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en un estándar ($\pm 20\%$), de lo contrario no se puede confirmar la presencia del analito en la muestra. PCB, corresponde al estándar interno que corrigió la inyección, y el isótopo de estrona ((3,4)¹³C₂ E1), corresponde al estándar “surrogate” que corrigió las pérdidas experimentales en la extracción.

Para cada determinación, se realizó una curva de calibración a partir de un multiestándar de 100 mgL⁻¹ de E1, E2 y EE2. La curva de calibración fue desde 5 µgL⁻¹ a 1000 µgL⁻¹.

2.9 Tratamiento de muestras para la determinación de las hormonas E1, E2 y EE2.

Se dispuso 0,25 g de suelo o biosólido en un tubo de vidrio cónico. Se enriqueció la muestra con 200 ngg⁻¹ de estándar “surrogate” (3,4)¹³C₂ E1. Los compuestos fueron extraídos tres veces con 5 mL de acetato de etilo asistido con ultrasonido por 15 minutos y luego se centrifugó por 15 minutos a 2500 rpm. Los extractos se recolectaron en viales ámbar de 20 mL y fueron llevados a sequedad bajo una corriente suave de gas nitrógeno a una temperatura de 50 °C. A continuación, se redisolviéron en 5 ml de metanol y 5 ml de agua Milli-Q completando así 10 mL de solución (Ying & Kookana, 2007; Cantarero, 2014). Las muestras se guardaron refrigeradas hasta su cuantificación.

2.9.1 Purificación de los extractos (“clean up”).

Para eliminar compuestos que puedan interferir o disminuir la sensibilidad de los analitos, fue necesario optimizar una metodología de SPE.

Los cartuchos Oasis HLB se acondicionaron con 3 mL de metanol, 3 mL de acetona, 3 mL de diclorometano y 3 mL de hexano. Luego, el extracto (que puede ser de suelo, biosólido o planta) fue cargado en el cartucho, y se lavó dos veces con 2 mL de hexano y dos veces más con 2 mL de agua Milli-Q. Los compuestos fueron eluidos con tres porciones de 3 mL de metanol/acetona 50:50 (v/v). Posteriormente, se llevó a sequedad por corriente de nitrógeno a una temperatura de 50 °C, y fue reconstituido en 1 mL de acetato de etilo (Chu & Metcalfe, 2007; Cantarero, 2014).

2.9.2 Derivatización de los extractos.

Las muestras antes de ser analizadas por GC/MS, fueron derivatizadas. Para ello se transfirió 100 µL del extracto a un vial ámbar de 2 mL y se evaporó con gas nitrógeno a una temperatura de 50 °C. Luego se le agregó 50 µL de reactivo derivatizante MSTFA y 50 µL de piridina. Esto se llevó a una temperatura de 80 °C por 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y finalmente se inyectaron 2 µL en el GC/MS (Azzouz & Ballesteros, 2010; Zhang & Zuo, 2005; Cantarero, 2014).

2.10 Determinación de la biodisponibilidad de las hormonas estrogénicas mediante bioensayo con plantas de trigo.

2.10.1 Enriquecimiento del biosólido con E1, E2 y EE2.

El biosólido fue enriquecido con el equivalente a 10 mgkg^{-1} de los compuestos E1, E2 y EE2, los cuales fueron agregados con un exceso de acetona a un balón de 250 mL. La mezcla de biosólido-hormonas fue agitada durante 24 horas en rotavapor. El balón se cubrió con papel de aluminio para evitar la fotodegradación de los compuestos (figura 7). Luego, el biosólido se traspasó a una cápsula y se dejó secar en oscuridad bajo campana.

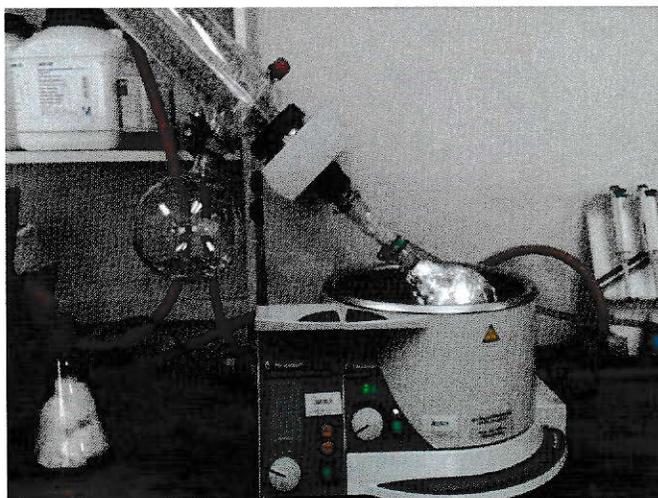


Figura 7: Incorporación de las hormonas al biosólido por homogenización en rotavapor.

2.10.2 Determinación de la fracción biodisponible de hormonas estrogénicas con plantas de trigo como bioindicador.

Se incorporó biosólido a los suelos en una proporción de 90 Mgha^{-1} (ver en Anexo, Tablas 13, 14 y 15). Para cada suelo se realizó un triplicado de suelo-biosólido, suelo-biosólido enriquecido y además se agregaron controles sin biosólido. Para lograr una mejor interacción del suelo con el biosólido, las mezclas se dejaron en bolsas plásticas por un periodo de estabilización de una semana en condiciones de humedad de campo y a 25°C .

Se utilizaron macetas plásticas de 500 cc de capacidad. En el fondo de ellas se dispuso una malla plástica y luego se agregó cuarzo para evitar pérdidas de muestra. Se sembraron 10 g (alrededor de 100 semillas) de semillas de trigo (*Triticum aestivum*) en aproximadamente 500 g de suelo tratado con biosólido, como se muestra en la figura 8.



Figura 8: Bioensayos de plantas de trigo.

El cultivo estuvo durante 28 días bajo ciclos de luz artificial de 14/10 horas (día/noche), con control diario de humedad por peso, regado con agua destilada al 70% de la capacidad de campo del suelo y a temperatura ambiente con una variación no superior a 5°C. Después del periodo de crecimiento, como aparece en la figura 9, se sacaron las plántulas de trigo y fueron lavadas con agua desionizada. Se separaron en dos fracciones correspondientes a la raíz y a la parte aérea, las cuales fueron liofilizadas para trabajar en base a peso seco. Luego de registrar su peso, se trituraron para extraer los analitos como se describió en el punto 2.9.



Figura 9: Plántulas de trigo tras 28 días de ser sembradas.

2.11 Estimación de la fracción biodisponible de hormonas, usando un método biosimulador de extracción con solución de ciclodextrina.

La estimación de la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 se realizó a través de una extracción simple con hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD). El método se realizó con 1 g de muestra (cada suelo con una dosis de 90 Mg ha^{-1} de biosólido o biosólido enriquecido con hormonas, además de un control para cada suelo), la que fue llevada a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se agregó 10 mL de solución de 50 mM de HPCD y se agitó por 2 horas, luego se centrifugó por 30 minutos a 2500 rpm, se decantó y se filtró con un filtro de fibra de vidrio con 1 μ m de tamaño de poro. Posteriormente, se agregó 10 mL de metanol a la solución, la cual fue dopada con 200 ngg $^{-1}$ de estándar “surrogate” (3,4) $^{13}C_2$ E1. La mezcla metanol-HPCD se sonicó por 1 hora y se dejó en reposo por 24 horas. Los analitos se extrajeron tres veces con 10 mL de una solución de acetato de etilo/diclorometano 50:50 (v/v) mediante agitación con vórtex. El extracto se evaporó con una corriente de nitrógeno a una temperatura de 50 °C, y se reconstituyó en 1 mL de acetato de etilo (F. Wong & T. F. Bidleman, 2010). La determinación de los compuestos fue a través de GC/MS.

2.12 Estudio de la actividad microbiana.

2.12.1 Determinación de CO₂ por titulación con HCl.

La determinación de la actividad microbiana, se realizó colocando 25 g de muestra (suelo-biosólido 90 Mg ha^{-1}) en frascos de vidrio de un litro. En el interior del frasco de vidrio, se dejó un vaso precipitado con agua destilada para mantener la humedad, y otro vaso precipitado con 10 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M. Los frascos se cerraron herméticamente y se incubaron a 25 °C durante cuatro semanas. La concentración de dióxido de carbono (CO₂) se determinó titulando el NaOH con ácido clorhídrico (HCl) 0,5 M luego de 24 horas de incubación, 14 días y una última medición a los 28 días (Anderson John P.E. 1982).

2.12.2 Determinación de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) por cromatografía iónica.

Se preparó una pasta de saturación en frascos plásticos de boca ancha, para lo cual se pesó 10 g de suelo, tratado con biosólido, y se le agregó 3,5 mL de agua desionizada y se mezcló con una espátula hasta formar una pasta semisólida. A cada frasco se le agregaron 3 gotas de cloroformo para inhibir la actividad microbiana. Luego se taparon los frascos y se dejaron refrigerados por 24 horas. Al día siguiente, se trasvasió la pasta a tubos de centrífuga y se centrifugó 30 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, se filtró el extracto a través de un portafiltro de MILLEX-HV con membrana de PVDF de 0,45 μm y 13 mm de diámetro, y se vació a tubos Eppendorf de 1 mL.

Las curvas de calibración se prepararon con estándares de 1000 mgL^{-1} de nitrato y amonio (Merck) en las concentraciones: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mgL^{-1} .

La determinación de amonio se llevó a cabo por cromatografía líquida de intercambio iónico (IE-HPLC). Para desarrollar este análisis, se preparó la fase móvil de cationes. Se pesó 0,0296 g de EDTA y se disolvió en agua desionizada, posteriormente se trasvasió a un matraz de 1 L. Se agregó 200 μL de HNO_3 , se aforó a 1 L y se filtró a través de una membrana de 0,45 μm . La fase móvil, se almacenó en una botella de vidrio ámbar a temperatura ambiente. Las condiciones experimentales del HPLC fueron las siguientes:

- Volumen de inyección: 50 μL
- Flujo fase móvil: 1 mLmin^{-1}
- Rango de sensibilidad: 0,001
- Conductividad de fase móvil: 950-1200 μScm^{-1}
- Columna: Resina de Cationes IC-Pck Cation M/D C-8 (+) Polar
- Detector: Conductividad (Waters 1515)
- Bomba: Isocrática (Waters 1515)
- Desgasificador: Waters in-line Desgasser AF

Una vez programado el equipo, se procedió a realizar las inyecciones correspondientes a las soluciones estándar de la curva de calibración, y finalmente las muestras. Las señales se identificaron por comparación de tiempos de retención (t_R), con las soluciones estándar (Núñez, 2011).

Para la determinación de nitrato por cromatografía líquida de intercambio iónico (IE-HPLC), se preparó la fase móvil con aniones. El concentrado de aniones se preparó pesando 34 g de ácido bórico y se trasvasijó a un matraz de 500 mL, se agregaron 23,5 mL de ácido glucónico; 8,6 g de hidróxido de litio monohidratado ($\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$), 250 mL de glicerina y se aforó a 500 mL con agua desionizada. Se almacenó en envases de vidrio ámbar a temperatura ambiente. Se tomó 28 mL de concentrado de aniones, se agregó 120 mL de acetonitrilo grado HPLC y se aforó a 1 L con agua milli-Q. Se filtró a través de una membrana de 0,45 μm y se almacenó en botellas ámbar a temperatura ambiente (Núñez, 2011).

Las condiciones experimentales del HPLC fueron las siguientes:

- Volumen de inyección: 50 μL
- Flujo fase móvil: 1,2 mLmin^{-1}
- Rango de sensibilidad: 0,001
- Conductividad de fase móvil: 500-1000 μScm^{-1}
- Columna: Resina de Aniones IC-Pck Anion HC
- Detector: Conductividad (Waters 1515)
- Bomba: Isocrática (Waters 1515)
- Desgasificador: Waters in-line Degasser AF



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización física y química de los suelos y del biosólido.

En la Tabla 3, se muestran las propiedades fisicoquímicas de los suelos y del biosólido que fueron utilizados como medio de cultivo para bioensayos con plantas de trigo. Ambos suelos tienen un pH moderadamente ácido, conductividad propia de un suelo no salino y una textura característica de suelos con poca materia orgánica. El suelo Lo Prado presenta un mayor porcentaje de materia orgánica que el suelo Chicauma, sin embargo, ambos se agrupan en la categoría de suelos con bajo contenido de materia orgánica (menor a 6%). Es importante notar la transferencia de materia orgánica y nitrógeno del biosólido a los suelos. Como se muestra en la Tabla 3, el biosólido contiene el doble de nitrógeno total (%) que los suelos y más de 10 veces el contenido de carbono orgánico total (%). En vista de ello, se podría sostener que el biosólido otorgaría condiciones más favorables para uso agrícola.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de los suelos y del biosólido*.

Sustrato	Suelo Lo Prado	Suelo Chicauma	Biosólido
pH	5,76	6,44	8,72
Conductividad a 25 °C (dSm ⁻¹)	0,10	0,10	4,43
Carbono orgánico (%)	2,79	1,93	43,01
Materia orgánica (%)	4,81	3,33	-
Nitrógeno total (%)	0,33	0,25	0,52
Capacidad de intercambio catiónico (cmolkg ⁻¹)	18,9	12,5	47,8
Factor de humedad	1,01	1,01	1,12
Densidad aparente (gmL ⁻¹)	1,20	1,22	-
Capacidad de Campo (%)	24	8,7	-
Textura	Arenosa franca	Arenosa	-

*Los valores de la Tabla 3, son resultados experimentales con un triplicado para cada experimento, y sus desviaciones estándar relativa no superaron el 5%.

En la Tabla 4, se muestra el contenido de metales pesados presentes en los suelos y en el biosólido. En lo que respecta al D.S N°004, artículos 22°, 23° y 24° ambos suelos, y el biosólido, están dentro de las concentraciones máximas de metales permitidas para la restauración de suelos degradados, con una tasa de aplicación de 90 Mg de biosólido por hectárea de suelo.

Tabla 4. Metales pesados en los suelos y en el biosólido.

Metal (mgkg⁻¹)	Suelo Lo Prado	Suelo Chicauma	Biosólido
Cu	90,4±3,1	130±4	652±17
Zn	93,4±4,0	111±8	1546±48
Pb	29,8±0,8	20,9±0,6	45,1±1,7
Ni	60,0±2,4	33,5±0,2	85,0±3,9
Cr	40,1±0,8	35,5±0,5	243±7,0
Cd	n.d*	n.d	2,68±0,06

(*) n.d, no detectado

Los metales traza son necesarios para los seres vivos en concentraciones muy bajas. Su abundancia en los suelos es variable, y depende de las características geoquímicas y morfológicas de cada suelo. El contenido de los metales que hay en un suelo no permite conocer su origen (Criterios de Calidad de Suelo Agrícola, SAG, 2005).

En suelos como Chicauma y Lo Prado, que son parte del perímetro urbano de la Región Metropolitana, su composición no se ha visto afectada por algún tipo de actividad antrópica de alto impacto como la minería, refinerías u otra industria pesada. Por ende, se presume que el contenido de metales es de origen natural (aunque no se descarta que ciertos metales se depositen en el suelo por emisiones atmosféricas de origen antrópico), con áreas en que abundan metales como Cobre y Zinc, muy característico de Chile (Criterios de Calidad de Suelo Agrícola, SAG, 2005).

Los biosólidos, en general, se caracterizan por ser una fuente importante de metales pesados, debido a que acumulan los desechos de diversas actividades antropogénicas.

De los metales que se muestran en la Tabla 4, el que reviste un mayor peligro, por la facilidad con la que se absorbe por las plantas, es el Cadmio. Este metal se encuentra en muy bajas concentraciones en los suelos, no debería exceder los 0,5 mg/kg en suelos libres de contaminación. No obstante, en biosólidos se permite un aporte muy limitado de este metal, dado el riesgo que conlleva su bioacumulación en las tramas tróficas (Criterios de Calidad de Suelo Agrícola, SAG, 2005).

Con respecto a si el biosólido aumenta la disponibilidad de metales pesados en el suelo receptor, diversos estudios han demostrado lo contrario, debido a que el alto contenido de carbono orgánico del biosólido mantiene inmovilizado a gran parte de los metales (Contreras, 2009). Lo que a su vez es respaldado por un estudio preliminar desarrollado por el SAG para la elaboración del Protocolo de Aplicación de Residuos Sólidos al Suelo, (2008).

3.2 Optimización de la metodología de extracción de las hormonas E1, E2 y EE2.

La metodología de extracción en fase sólida, fue optimizada para obtener mejores porcentajes de recuperación. El resultado del acondicionamiento de la fase adsorbente del cartucho Oasis HLB, permitió una óptima retención de los compuestos. La fase sorbente Oasis HLB es un relleno de fase inversa con balance hidrofílico-lipofílico. La fase se activó al impregnarla primero con solventes polares, como metanol y acetona, y luego con solventes apolares como diclorometano y hexano. La superficie de contacto se volvió apolar para que fuera más afín con compuestos lipofílicos como las hormonas estrogénicas.

La fase estacionaria del cartucho Oasis HLB, al tener un carácter anfipático, retiene a los analitos en su parte apolar por su extremo hidrofóbico gracias a un grupo de divinilbenceno que mantiene interacciones del tipo π con los anillos conjugados del compuesto aromático, y por su extremo hidrofílico de copolímero de N-vinyl-pyrrolidona que interactúa con los grupos hidroxilo de las hormonas (Weigel y col, 2004).

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la limpieza de la muestra a través del cartucho Oasis HLB.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de las hormonas estrogénicas en la etapa de limpieza de los extractos (n=3).

Variación en la metodología	Recuperación E1 (%)	Recuperación E2 (%)	Recuperación EE2 (%)
Sin lavar la muestra	53,2±1,0	83,6±2,3	62,4±0,9
Lavado con hexano	92,4±1,9	88,4±2,3	92,3±2,0
Lavado con hexano y agua	94,7±0,8	99,3±0,6	96,7±1,3

La optimización de la técnica consistió en que una vez cargada la muestra en el cartucho, se lavó con hexano y luego con agua, puesto que los compuestos de interés no eluyen con ninguno de esos solventes, pero si lo hacen otros compuestos que pueden interferir con la señal de las hormonas, si tienen tiempos de retención cercanos. Como se muestra en la Tabla 5, dicho procedimiento se validó con sobre el 90% de recuperación.

En la Tabla 6, se muestra cómo la polaridad relativa de estos compuestos hace que eluyan eficazmente con la mezcla de metanol/acetona 1:1 (v/v), con una recuperación por sobre el 90%. Por otro lado, una elusión con acetato de etilo no mostró buenos resultados, por lo que es un buen solvente para la extracción desde la matriz, pero no desde la fase sorbente del cartucho Oasis HLB.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de las hormonas estrogénicas tras cambiar de solvente en la elusión de la muestra (n=3).

Solvente de elusión	Recuperación E1 (%)	Recuperación E2 (%)	Recuperación EE2 (%)
Acetato de etilo	37,6±0,7	42,3±1,2	39,9±1,0
Metanol/Acetona 1:1 (v/v)	98±1,3	89,7±0,3	93,5±1,7

Finalmente, cada extracto se llevó a sequedad con una corriente de N₂ a una temperatura de 50 °C, y se reconstituyó en 1 mL de acetato de etilo, y no en metanol como sugieren los autores Chu y Metcalfe, (2007), pues como las hormonas se debieron derivatizar, y el derivatizante reacciona con el OH del metanol, se produciría un consumo innecesario del agente derivatizante (Corrotea, 2013).

3.3 Optimización de la derivatización de las hormonas E1, E2 y EE2.

La derivatización es un paso previo al análisis cromatográfico en GC/MS, indispensable para compuestos cuya constante de Henry es muy baja. En el caso de las hormonas, la constante de Henry para E1 es $3,8 \cdot 10^{-10}$, para E2 es $3,64 \cdot 10^{-11}$ y $7,94 \cdot 10^{-12}$ atm*m³/mol para EE2. Estos valores tan bajos, denotan una baja volatilidad de los compuestos, lo que dificulta su análisis por cromatografía gaseosa.

Para compuestos como EE2 y E2, que contienen más de un grupo funcional OH derivatizable, se requiere obtener un solo producto en la derivatización para así lograr un máximo de sensibilidad, especificidad y precisión, es por esto que la selección del método de derivatización fue de gran importancia.

La piridina es un compuesto de uso común en la derivatización. Como solvente aprótico y base de Lewis, puede activar los grupos hidroxilo, mediante un ataque nucleofílico para poder obtener un solo producto doblemente sililado, pese a los impedimentos estéricos. Solventes como hexano y acetato de etilo no fueron capaces de impedir la formación de los subproductos Mono-TMS-EE2 y TMS-E1 en la derivatización de EE2, pues al ser solventes orgánicos neutros, no facilitan la formación del intermediario necesario para dejar disponible los grupos OH de las hormonas estrogénicas (Zhan & Zuo, 2005).

En la figura 10, se muestran los productos obtenidos en la derivatización incompleta de EE2: el TMS-E1, que proviene de la formación de estrona, ya que la hormona EE2 puede perder su grupo etinil dando paso a la formación del producto de derivatización de E1; y el Mono-TMS-EE2, que proviene de la derivatización del grupo OH de EE2 con menor impedimento estérico.

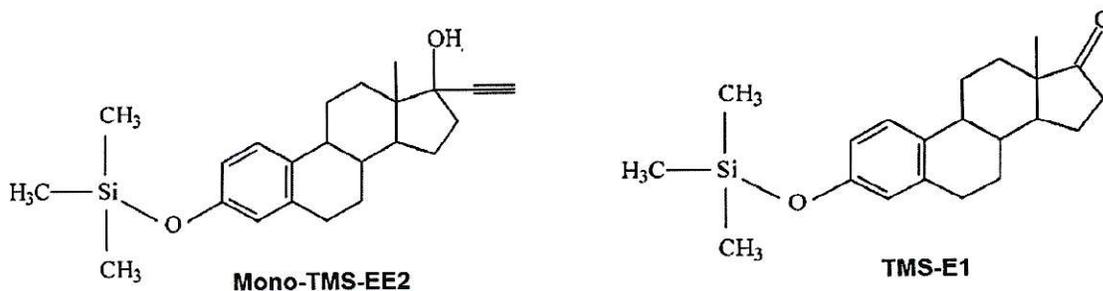


Figura 10: Subproductos de la derivatización de EE2 con MSTFA.

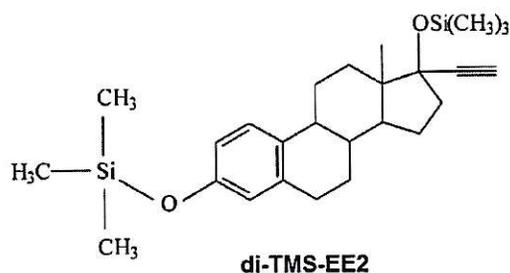


Figura 11: Di-TMS-EE2. Producto único en la derivatización con MSTFA y piridina 1:1 (v/v).

En la figura 11, se muestra el producto esperado de la derivatización de EE2. Por lo tanto, la piridina actúa como catalizador de la reacción y junto con el reactivo MSTFA, en razón 1:1 (v/v), facilitó la derivatización de EE2 que condujo a la generación de un único producto completamente sililado, el di-TMS-EE2.

En la figura 12, se muestra la señal de EE2 derivatizada con MSTFA y piridina. Su tiempo de retención fue de 24,75 minutos, y al comparar con la misma hormona derivatizada solo con MSTFA (figura 13), se observó que la intensidad de la señal disminuyó considerablemente, lo que entorpecería su cuantificación en matriz.

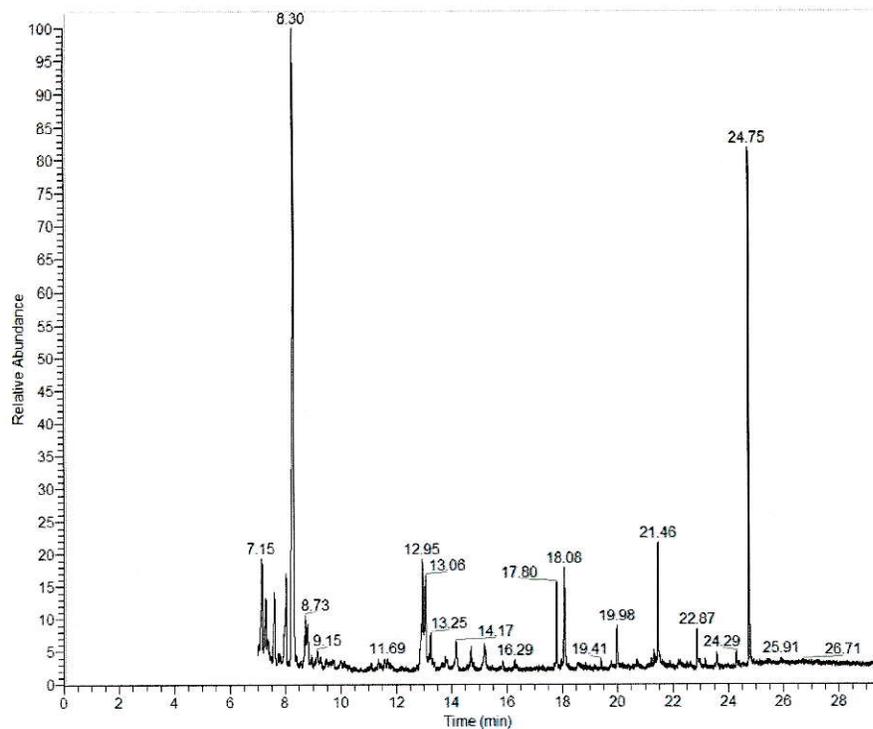


Figura 12: Señal cromatográfica de EE2, derivatizada con MSTFA/piridina (1:1).

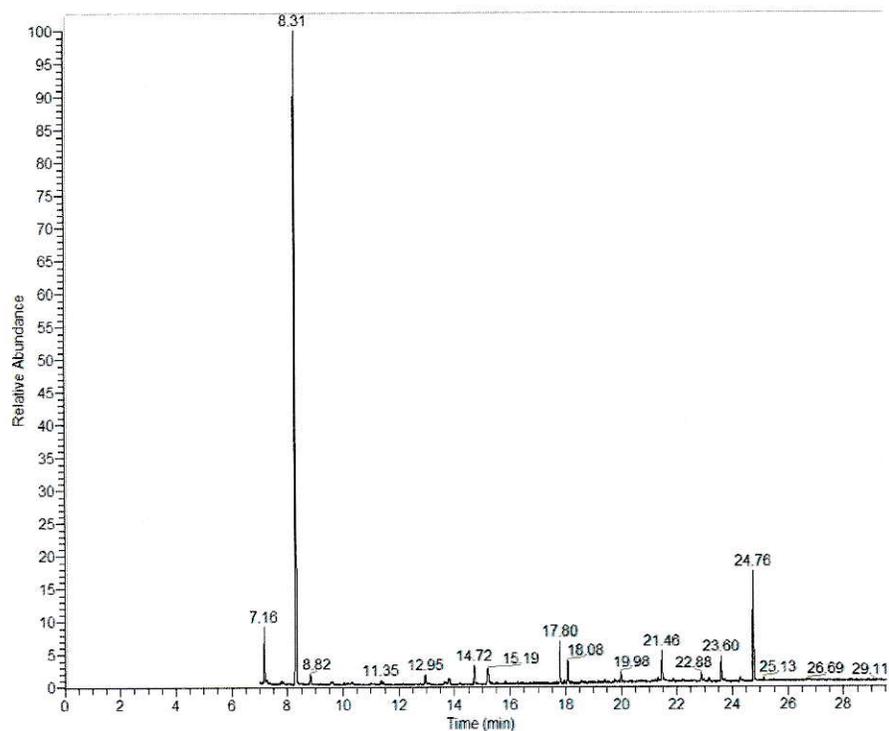


Figura 13: Señal cromatográfica de EE2, derivatizada con MSTFA.

Para las hormonas E1 y E2, no se encontró variación en la señal cromatográfica respecto a la derivatización con piridina (ver en Anexo las figuras 25, 26, 27 y 28), por lo que para el análisis simultáneo de las tres hormonas se utilizó la metodología propuesta por los autores Zhang y Zuo, (2005) que precisa piridina, en la misma proporción que el reactivo derivatizante MSTFA.

La temperatura óptima para que ocurra la reacción de derivatización completa de las hormonas fue de 80 °C, por un periodo de 30 minutos (Cantarero, 2014). De este modo, se logró apreciar una señal para cada una de ellas, las que a su vez fueron corroboradas por la librería NIST, como se muestra en las figuras 14, 15 y 16.

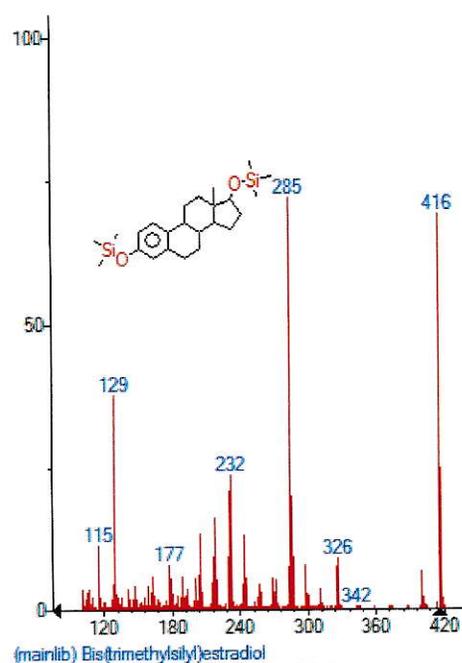
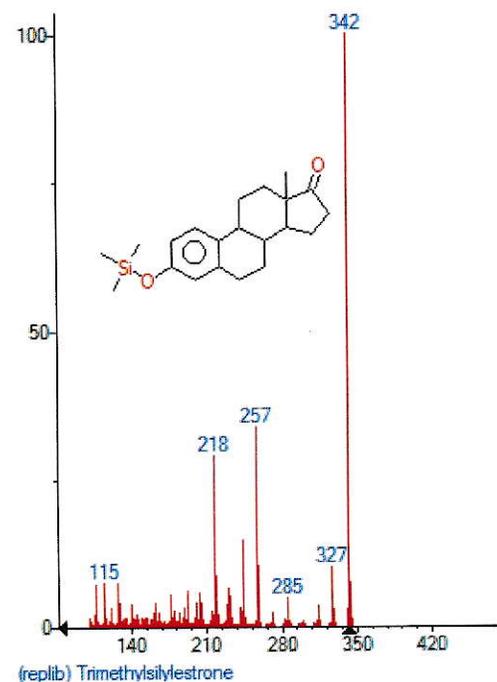


Figura 14: Trimetilsililestrona TMS E1. **Figura 15:** (bi) Trimetilsililestradiol TMS E2.

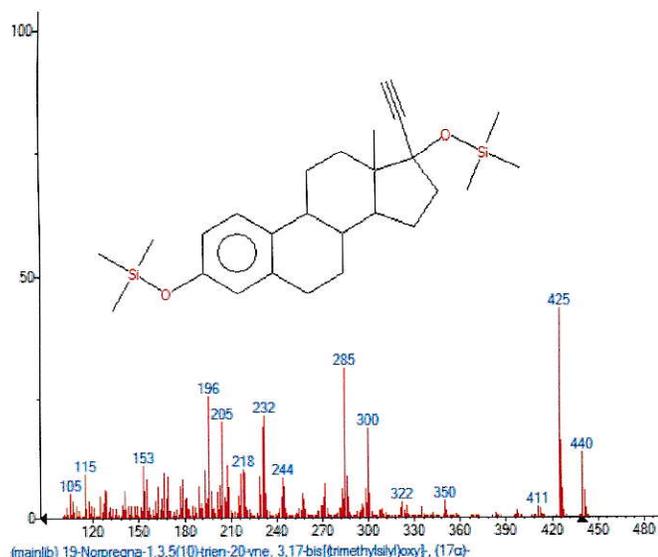


Figura 16: (bi) Trimetilsilil etinil estradiol TMS EE2.

En la Tabla 7, se dan a conocer los parámetros cromatográficos que permitieron el reconocimiento de las hormonas E1, E2 y EE2. Además de los estándares interno (PCB) y “surrogate” de E1. El tiempo de retención de las tres hormonas es relativamente parecido. Sin embargo, la técnica analítica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, ofrece una separación altamente eficaz y selectiva, puesto que la fragmentación de la molécula da origen a dos iones característicos, el primario que cuantifica al analito y el secundario que corrobora su identidad.

Tabla 7. Tiempos de retención y masas de los iones correspondientes a los compuestos sililados.

Analitos	Tiempo de Retención (min)	Ion de cuantificación	Ion de identificación
		m/z	m/z
E1	23,56	342	257
(3,4) ¹³ C ₂ E1	23,56	344	259
E2	23,86	285	416
EE2	24,75	425	440
PCB	19,89	292	290

3.4 Determinación del contenido de hormonas en el biosólido.

A continuación, en la Tabla 8, se dan a conocer los parámetros analíticos obtenidos del instrumento de análisis cromatográfico GC/MS. El coeficiente de variación entrega información acerca de la precisión del método, por lo que la metodología de extracción de hormonas desde matrices naturales, se validó en función del resultado de su repetibilidad. Para todos los parámetros que se muestran en la Tabla 8, EE2 es el analito que presentó mejores resultados, lo que puede atribuirse a su estabilidad molecular o a su baja susceptibilidad al efecto matriz, que en ocasiones disminuye la sensibilidad.

Tabla 8. Límite de detección y cuantificación del instrumento y coeficiente de variación del método.

Parámetro analítico	E1	E2	EE2
Límite de detección (μgL^{-1})	6,09	4,07	3,90
Límite de cuantificación (μgL^{-1})	20,30	13,57	13,00
Coefficiente de variación (%CV)	10,12	13,11	5,72

En el biosólido de la planta de tratamiento de aguas servidas (Junio, 2015), no se encontraron hormonas estrogénicas naturales, E1 y E2, solo se encontró EE2, en una concentración de $150,10 \pm 6,4 \mu\text{gkg}^{-1}$.

3.5 Determinación de la fracción biodisponible de las hormonas E1, E2 y EE2 mediante un bioensayo con plantas de trigo.

La biodisponibilidad de los compuestos que existen en el suelo, está asociada a las características del suelo, de la planta y a las condiciones climáticas (humedad relativa, cantidad de agua, luz solar, etc). Simulando las condiciones idóneas en que crecen los cultivos de trigo, fue posible rastrear la asimilación de las hormonas por la planta.

Los resultados graficados en la figura 17, sugieren que gran parte de las hormonas contenidas en el suelo tratado con biosólido serían degradadas a lo largo del tiempo, siendo EE2 la más persistente en comparación con las hormonas naturales.

Para contemplar la dinámica de las tres hormonas, fue necesario enriquecer el biosólido con estándares de E1, E2 y EE2, para luego incorporarlo como enmienda a los suelos. De este modo, se estudió el destino y persistencia de cada una de ellas, a través de un cultivo de plantas de trigo.

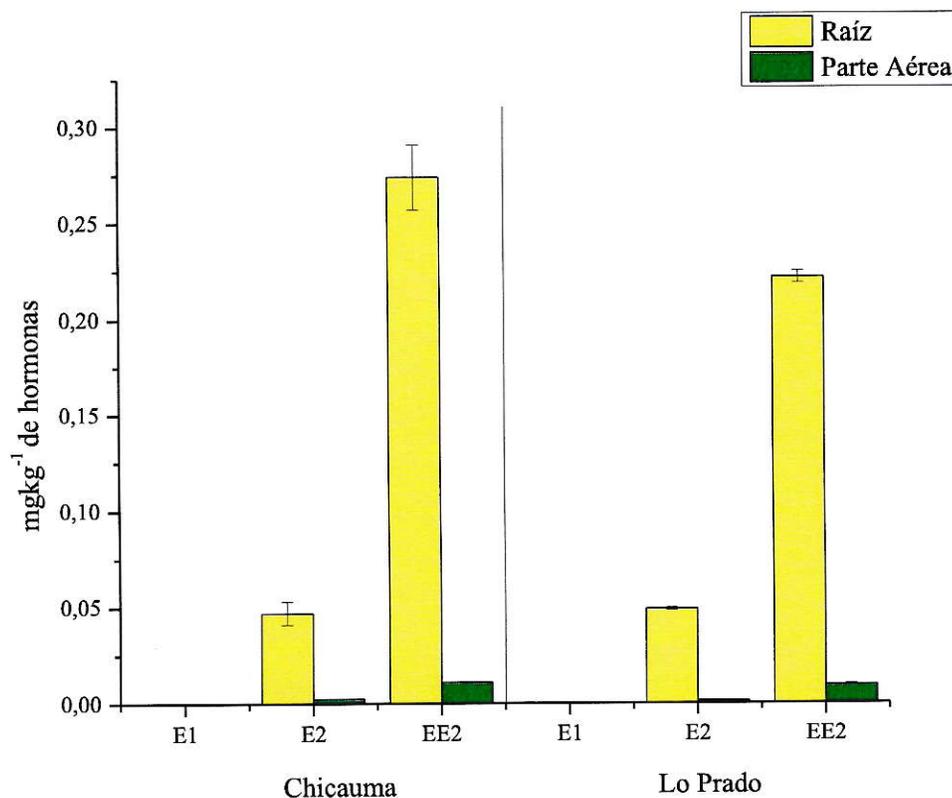


Figura 17: Concentración de hormonas encontradas en las raíces y parte aérea de las plantas de trigo cultivadas en suelos tratados con biosólido enriquecido con hormonas.

En la figura 17, se observa que las hormonas estrogénicas se concentraron mayoritariamente en la raíz de las plantas, lo que pudo deberse al carácter lipofílico de los compuestos y también a la baja concentración de hormonas que había en el suelo.

En el suelo Lo Prado, que posee más materia orgánica que el suelo Chicauma, se encontró una concentración de hormonas en las plantas menor que en el suelo Chicauma. Esto hace pensar, que la materia orgánica tiene una función amortiguadora de

contaminantes orgánicos, de tal manera que los retiene impidiendo el transporte de ellos hacia la planta (Stumpe & Marschner, 2010).

En esta misma línea investigativa, se ha encontrado que distintos suelos tratados con diferentes tipos de enmienda reaccionan de manera similar respecto a la sorción de estrógenos. En efecto, el contenido de carbono orgánico presente en el suelo (COS) estimula la sorción de compuestos orgánicos, lo cual contribuye a la mineralización de los mismos (Stumpe & Marschner, 2010).

Estudios similares hechos por Stumpe y Marschner (2010), muestran valores de K_d , (coeficiente de distribución suelo/solución suelo), más altos para estrógenos en suelos tratados con biosólidos. Esto se explica dado que la hidrofobicidad de estos compuestos los confinaría a la fase orgánica del suelo, siendo E1 la hormona que presenta los valores de K_d más altos (45-145 mLg^{-1}), lo que además favorece su degradación, seguido de EE2 (40-96 mLg^{-1}) y por último E2 (20-80 mLg^{-1}).

Valores altos de K_d y de K_{oc} , guardan estrecha relación con los resultados obtenidos en los bioensayos con plantas de trigo. En efecto, la hormona que tiende a permanecer más retenida en el suelo, E1, no fue detectada en el análisis de plantas mediante GC/MS. Mientras que las hormonas E2 y EE2 pudieron ser detectadas en las plantas cultivadas en suelos tratados con biosólido enriquecido, por lo que, para estos efectos, son consideradas biodisponibles.

Distintos autores han estudiado la conversión oxidativa de E2 en E1 en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en lodos activados, lo que sugiere una acumulación de E1 que, sin embargo, no se encontró biodisponible para las plantas de trigo.

El pH del suelo también es un factor influyente en el comportamiento de las hormonas. El pK_a de E1, E2 y EE2 es 10,20; 10,27 y 10,24 respectivamente, y al ser ambos suelos de pH moderadamente ácido, las hormonas se encontrarían en su forma protonada (neutra), lo que dificultaría aún más el transporte de ellas en solución acuosa.

El factor de bioconcentración, se calculó mediante la expresión 1, para conocer qué fracción de las hormonas es asimilada por la planta.

$$FBC = \frac{\text{Concentración en el tejido de la planta } (\mu\text{gkg}^{-1})}{\text{Concentración en el suelo } (\mu\text{gkg}^{-1})} \quad (1)$$

Tabla 9. Factor de bioconcentración de las plantas cultivadas en suelos tratados con biosólido natural y enriquecido con hormonas E1, E2 y EE2.

Matriz tratada	FBC E1	FBC E2	FBC EE2
Raíz en suelo Chicauma B	-	-	0,72
Raíz en suelo Chicauma B-E	-	0,15	0,70
Raíz en suelo Lo Prado B	-	-	0,54
Raíz en suelo Lo Prado B-E	-	0,01	0,54
P.A en suelo Chicauma B-E	-	0,01	0,03
P.A en suelo Lo Prado B-E	-	-	0,02

B-E, Biosólido enriquecido con 10 mgkg⁻¹ de hormonas; B, Biosólido natural.
P.A, parte aérea; n.d, no detectado.

En Tabla 9, se muestra el factor de bioconcentración calculado para las plantas de trigo cultivadas en el suelo Lo Prado y Chicauma tratado con biosólido. Estos valores evidencian el transporte de las hormonas desde el suelo a las raíces. El porcentaje más alto de bioconcentración se manifiesta en el suelo Chicauma tratado con biosólido natural, con un 72% de la concentración inicial de EE2 en las raíces de trigo, lo que no se diferencia mayormente del obtenido con biosólido enriquecido (70%), por lo que la concentración de hormonas no parece alterar el factor de bioconcentración.

En la parte aérea de las plantas cultivadas en el suelo tratado con biosólido natural, la concentración de las hormonas estuvo bajo el límite de detección, mientras que en los suelos tratados con biosólido enriquecido, se observó una considerable baja del factor de bioconcentración de EE2 en la parte aérea respecto a la raíces.

Por otro lado, cabe señalar que el coeficiente de partición octanol-agua (Log K_{ow}), hace alusión a la preferencia que tienen las hormonas por la fase orgánica de cualquier matriz, lo que explicaría la baja transferencia a la parte aérea de las plantas.

3.5 Determinación de la fracción biodisponible de las hormonas E1, E2 y EE2 mediante un método biosimulador con ciclodextrina.

La hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), fue utilizada como biosimulador dado que su estructura macrocíclica es capaz de formar complejos que atrapan muy eficientemente un sustrato hidrofóbico. Su uso se ha masificado para estos fines, ya que permite la solubilización de sustancias hidrofóbicas en solventes polares como el agua, que es el más abundante en la naturaleza (Contreras, 2001).

Para optimizar la metodología propuesta por F. Wong (2010), fue necesario probar los solventes de extracción. En la Tabla 10, se registraron los porcentajes de recuperación con distintas mezclas de solventes, donde la que mostró mejor resultado fue diclorometano y acetato de etilo en la proporción 1:1 (v/v) con cerca de un 100% de recuperación.

Tabla 10. Resultado de la optimización de solvente de extracción de las hormonas estrogénicas (n=3).

Solvente de extracción	Recuperación de E1 (%)	Recuperación de E2 (%)	Recuperación de EE2 (%)
Hex/DCM 1:1 (v/v)	0	0	0
Hex/AE 1:1 (v/v)	47,6 \pm 1,4	32,0 \pm 1,0	52,8 \pm 1,7
DCM/AE 1:1 (v/v)	99,0 \pm 2,1	99,8 \pm 2,0	100 \pm 2

Hex/DCM, Hexano/Diclorometano

Hex/AE, Hexano/Acetato de Etilo

DCM/AE, Diclorometano/Acetato de Etilo

El pK_a de HPCD es de 12,20 debido a esto, en ambos suelos la macromolécula se encontró protonada y su interacción con las hormonas sería del tipo hidrofóbica (Van der Waals) y puentes de hidrógeno (Contreras, 2001).

Las figuras 18, 19 y 20 muestran los resultados de la extracción de hormonas con ciclodextrina, comparado con el total de hormonas encontradas en la planta (raíz + parte aérea).

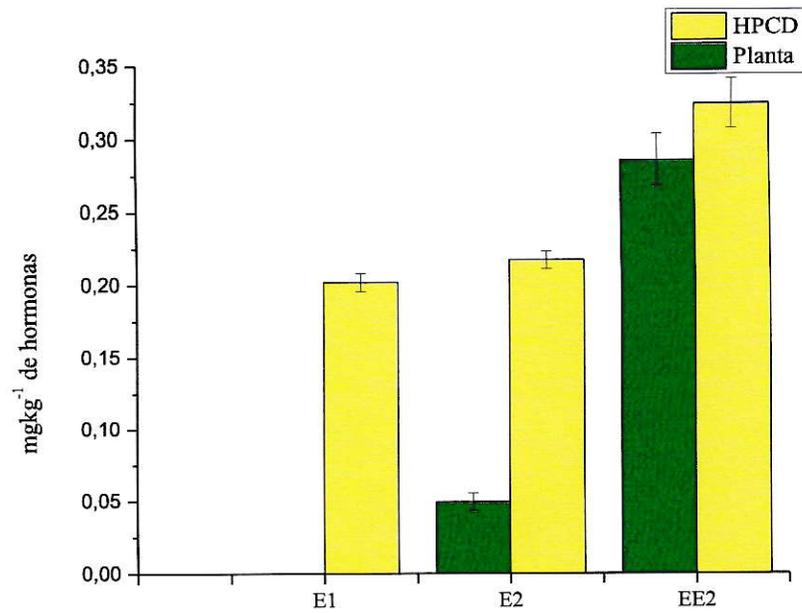


Figura 18: Comparación del contenido de hormonas en plantas de trigo y el método biosimulador de ciclodextrina HPCD en el suelo Chicauma tratado con biosólido enriquecido.

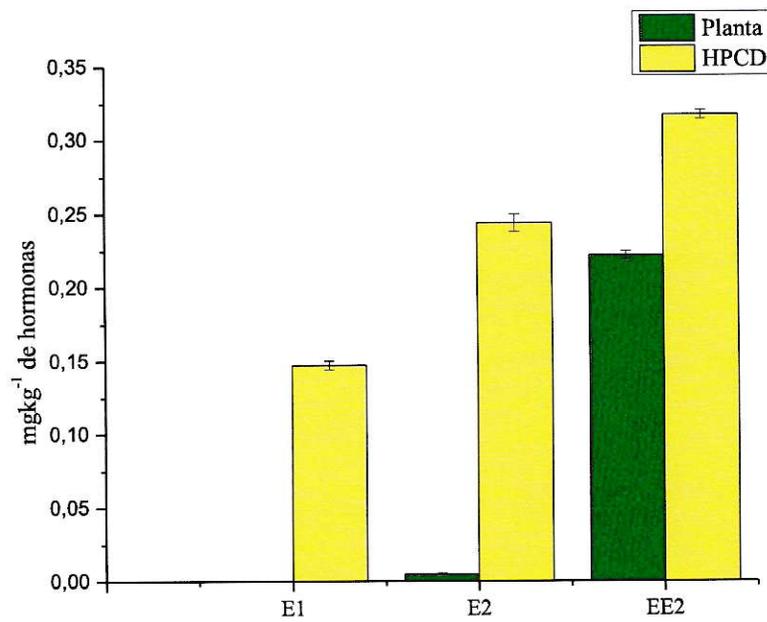


Figura 19: Comparación del contenido de hormonas en plantas de trigo y el método biosimulador de ciclodextrina HPCD en el suelo Lo Prado tratado con biosólido enriquecido.

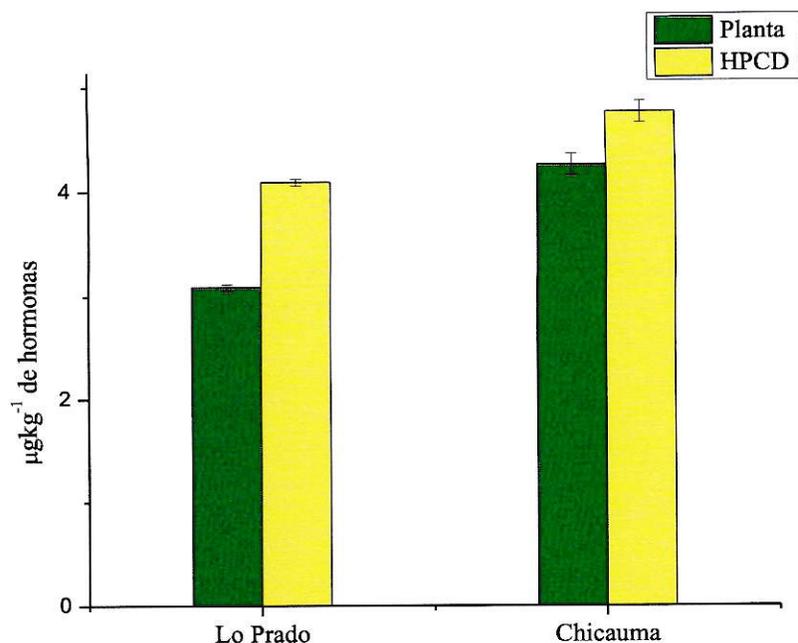


Figura 20: Biodisponibilidad de EE2 en la planta de trigo comparada con la extracción con ciclodextrina HPCD en los suelos tratados con biosólido natural.

Los resultados graficados en las figuras 18, 19 y 20, muestran que con el método biosimulador de extracción con ciclodextrina HPCD, se replica la tendencia observada en las plantas de trigo, siendo EE2, la hormona más persistente y la única encontrada en el biosólido natural (figura 20). Para comprender la correlatividad que pudiese existir entre los bioensayos y el método biomimético, fue necesario aplicarlo en los suelos tratados con biosólido enriquecido, de modo que en las figuras 18 y 19, se advierte cierta similitud en el comportamiento de la planta y el de HPCD, donde ambos presentaron un orden de concentración de analito extraíble de EE2>E2>E1.

En la Tabla 11, se muestra que el suelo Chicauma tiene un factor de bioconcentración mayor que el suelo Lo Prado. En consecuencia, la ciclodextrina también se ve influenciada por el tipo de suelo y, por tanto, es lo que determinó su capacidad de extracción.

Tabla 11. Factor de bioconcentración del método biosimulador con ciclodextrina (HPCD).

Matriz tratada	FBC E1	FBC E2	FBC EE2
HPCD suelo Chicauma B	-	-	0,80
HPCD suelo Chicauma B-E	0,68	0,68	0,82
HPCD suelo Lo Prado B	-	-	0,72
HPCD suelo Lo Prado B-E	0,68	0,69	0,77

Para validar esta metodología fue necesario correlacionar los valores obtenidos en la extracción con HPCD y los registrados en el bioensayo con plantas de trigo. Para la correlación solo se consideró EE2, dado que es la hormona que proporcionó más valores de concentración en los bioensayos.

En la Tabla 12, se ordenaron los promedios de cada extracción de EE2 en los diferentes sustratos; luego se sometieron los valores a un test de correlación simple que permitiese validar el método biosimulador de extracción con HPDC mediante parámetros estadísticos.

Tabla 12. Correlación del método biosimulador con los resultados obtenidos en el cultivo de plantas de trigo para EE2.

Suelo	EE2 con HPCD (μgkg^{-1})	EE2 en planta de trigo (μgkg^{-1})
Lo Prado B	4,09	3,09
Chicauma B	4,76	4,26
Lo Prado B-E	317	231
Chicauma B-E	323	285

Ecuación de correlación:

$$\text{HPCD} = 0,043022 + 1,06236 * \text{Planta} \quad (2)$$

p-value = 0,000

Coefficiente de correlación de Pearson (r) = 0,991

El test de correlación simple, utilizando los valores de la Tabla 12, mostró una línea de tendencia, descrita en la expresión 2, con parámetros estadísticos admisibles, $p\text{-value} \leq 0,05$ y $r = 0,99$. Por lo tanto, es comparable el método de extracción de EE2 con HPCD, con la fracción biodisponible de EE2 en plantas de trigo. Esto permite validar la metodología en las circunstancias que aquí se mencionan.

3.6 Determinación de la biomasa de las plantas cultivadas en suelos tratados con biosólido.

En este análisis se compararon los pesos de las plantas de trigo que crecieron en los suelos control, en los suelos tratados con biosólido natural y en aquellos tratados con biosólido enriquecido con hormonas.

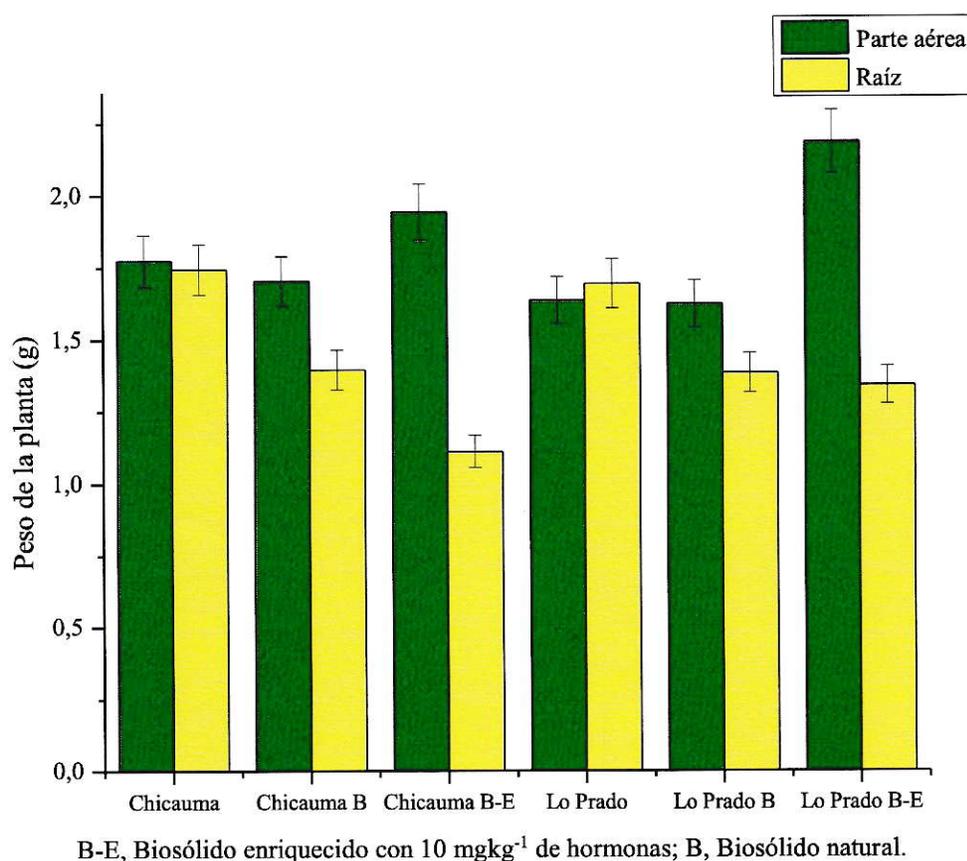


Figura 21: Biomasa de las plantas de trigo cultivadas en los suelos Chicauma y Lo Prado tratados con 90 Mgha^{-1} de biosólido.

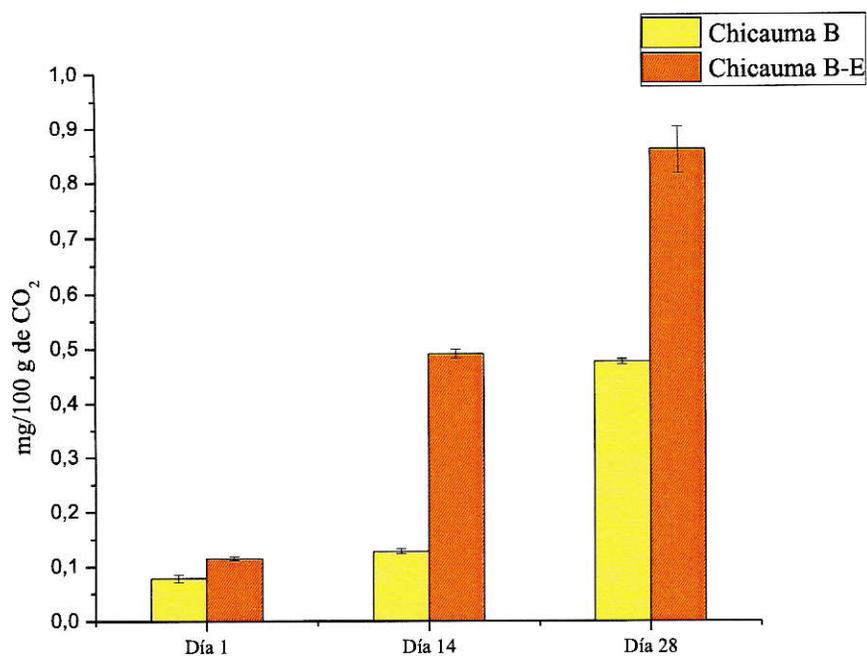
Analizando la figura 21, es posible inferir que el total de biomasa permaneció relativamente constante en los distintos escenarios en que crecieron las plantas. Vale decir, no se encontraron resultados disímiles entre las plantas que crecieron en los suelos sin ningún tipo de abono, y las que crecieron en un suelo tratado con biosólido natural o enriquecido. Por lo tanto, es posible inferir que la planta de trigo no manifestó susceptibilidad a la actividad estrogénica en términos de crecimiento.

3.8 Determinación de la actividad microbiana.

La microbiota que habita en los suelos es estudiada en función de la degradación de la materia orgánica existente y los atributos que esto conlleva. En este sentido, fue relevante determinar la actividad microbiana, puesto que la ausencia o baja concentración de las hormonas naturales E1 y E2, encontrada en las plantas, pudo ser consecuencia de la degradación por parte de los microorganismos en el suelo.

La respiración de los seres vivos da cuenta de su actividad metabólica, donde diversos compuestos son el sustrato de las reacciones bioquímicas. Tanto de la degradación como de la mineralización de compuestos orgánicos se obtiene CO₂ como producto final, por ello su cuantificación sirve como referencia para conocer la actividad microbiana del suelo.

Las figura 22 y 23, muestran la influencia que ejercen las hormonas estrogénicas sobre la actividad microbiana de cada suelo.

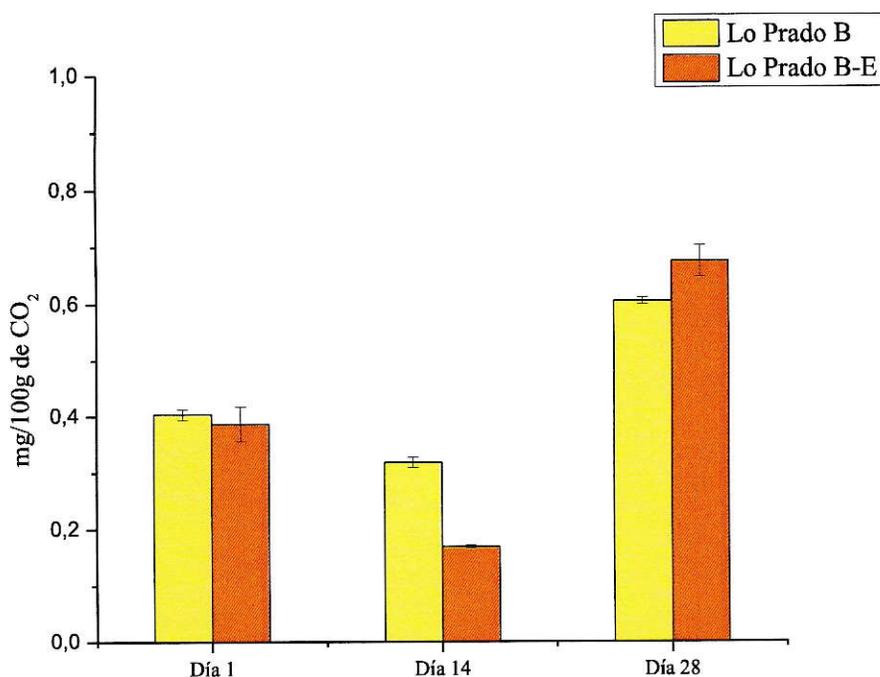


B-E, Biosólido enriquecido con 10 mgkg⁻¹ de hormonas; B, Biosólido natural.

Figura 22: Actividad microbiana en el suelo Chicauma con y sin enriquecimiento de hormonas.

En la figura 22, se observa una amplia diferencia entre el suelo Chicauma tratado con biosólido natural y el mismo suelo tratado con biosólido enriquecido, lo que podría deberse a que las hormonas constituyen un insumo atractivo para los microorganismos cuyos productos de degradación son posteriormente mineralizados a CO₂. Además presentó un claro aumento de la actividad con el avance de los días, lo que guarda relación con la reproducción de los microorganismos a lo largo del tiempo, lo que a su vez aumenta la concentración de CO₂.

Como se muestra en la figura 23, el suelo Lo Prado tratado con biosólido natural, presentó una mayor actividad microbiana que el suelo Chicauma en las mismas condiciones. Esto puede deberse a que naturalmente el suelo Lo Prado tiene un mayor contenido de materia orgánica que el suelo Chicauma.



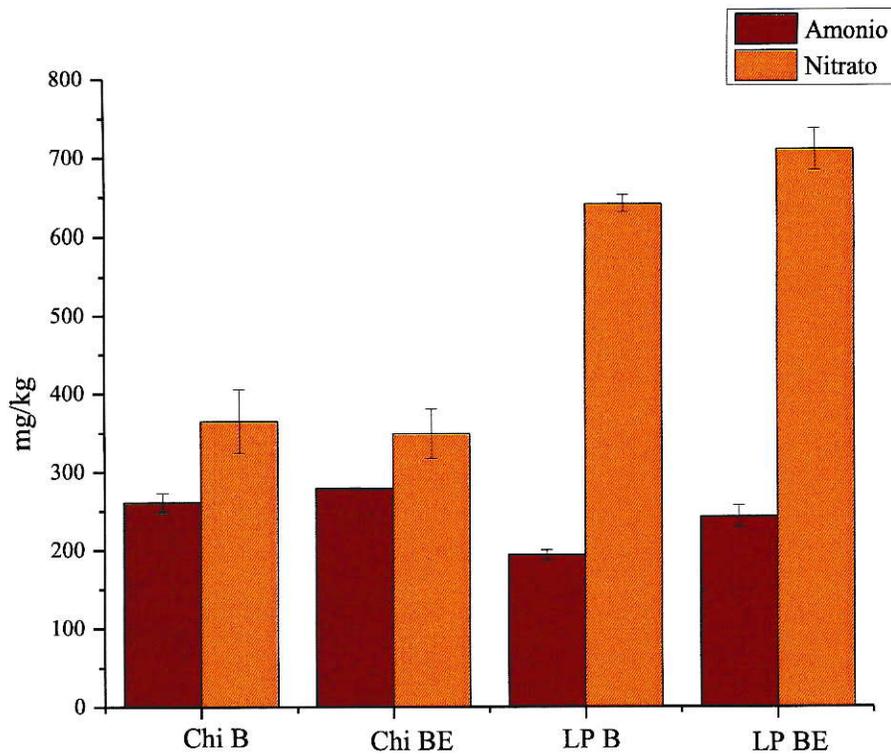
B-E, Biosólido enriquecido con 10 mgkg⁻¹ de hormonas; B, Biosólido natural.

Figura 23: Actividad microbiana en el suelo Lo Prado con y sin enriquecimiento de hormonas.

Para el suelo Lo Prado, la figura 23 no muestra una diferencia tan clara entre el suelo tratado con biosólido natural y el suelo tratado con biosólido enriquecido. Esto pudo deberse a que la actividad fúngica y bacteriana no se vio potenciada por la presencia de hormonas en el biosólido, o bien la baja disponibilidad de las hormonas en este suelo, impidió que éstas ejercieran alguna influencia sobre la actividad microbiana.

La actividad microbiológica del suelo, también puede estimarse en función del contenido de las especies predominantes del ciclo del nitrógeno.

El amonio (NH₄⁺) y el nitrato (NO₃⁻), dan cuenta del poder de degradación de la materia orgánica que tienen las bacterias a través de la generación de amonio (amonificación) y de la conversión oxidativa de amonio a nitrato (nitrificación). Dada la importancia que tiene el ciclo del nitrógeno en la fertilidad de un suelo, fue necesario analizar si se vio afectado por la presencia de hormonas estrogénicas.



B-E, Biosólido enriquecido con 10 mgkg^{-1} de hormonas; B, Biosólido natural.

Figura 24: Nitrato y Amonio en suelos tratados con y sin enriquecimiento de hormonas.

Los resultados de la determinación de nitrato y amonio por IE-HPLC, graficados en la figura 24, muestran que no hubo mayor diferencia entre el suelo tratado con biosólido natural y enriquecido.

Sin embargo, un estudio de Flores (2010), acerca de la biodegradación de hormonas estrogénicas, apunta a que sus transformaciones en el suelo están estrechamente relacionadas con la actividad nitrificante, de tal manera que el amonio del suelo se convierte en un insumo para las bacterias nitrificantes como los nitrosomonas y nitrobacter, que son capaces de degradar E1, E2 y EE2, esta última fue considerada como recalcitrante y principal contribuyente de la actividad estrogénica en el ambiente. En efecto, se puede establecer una relación directa entre la actividad nitrificante y actividad metabólica de las bacterias responsables del ciclo del nitrógeno, lo que eventualmente podría dar paso a un cometabolismo de las hormonas estrogénicas en el suelo.

IV. CONCLUSIONES

- Las hormonas naturales E1 y E2 no fueron detectadas, por lo que se encontraron bajo el límite de detección en el biosólido. Solo fue posible determinar EE2, en una concentración de $150,10 \pm 6,4 \mu\text{kg}^{-1}$. De la metodología de extracción y cuantificación se obtuvieron buenos parámetros analíticos y porcentajes de recuperación admisibles.
- En las plantas que crecieron en los suelos tratados con biosólido natural, se encontró EE2 en las raíces y no en la parte aérea.
- Los suelos Chicauma y Lo Prado, mostraron diferencias en el estudio de biodisponibilidad. El suelo Lo Prado, redujo la biodisponibilidad de las hormonas, generando un efecto amortiguador para estos efectos. Además, el pH débilmente ácido de los suelos, sumado a la baja solubilidad de las hormonas, minimizó su transporte desde la solución del suelo a la planta.
- En los suelos tratados con biosólido enriquecido con E1, E2 y EE2, se observó una dinámica distinta para cada hormona. E1, no fue encontrada en ninguna parte del tejido vegetal, lo que se condice con su alto coeficiente de distribución (Kd) informado en la literatura. En cambio, E2 y EE2, fueron encontradas en las raíces, y sólo EE2 alcanzó la parte aérea en concentraciones cercanas al límite de detección.
- Considerando lo anterior, las hormonas fueron encontradas en concentraciones cuantificables en la parte aérea solo en aquellas plantas que fueron cultivadas en suelos tratados con biosólido enriquecido. Su biodisponibilidad se redujo a las raíces, y el FBC de E2 fue más bajo que el de EE2.
- Con el objetivo de validar una metodología alternativa a los bioensayos con plantas de trigo, se implementó una extracción de las hormonas desde los mismos suelos con ciclodextrina como método biosimulador. Debido a que las hormonas E1 y E2 no mostraron niveles significativos de biodisponibilidad, la extracción con ciclodextrina solo pudo ser comparada para EE2. El test de correlación simple, permitió validar la

metodología con parámetros estadísticos de menos de 0,05 para p-value y 0,99 para r, los que avalan que existe una relación significativamente estadística entre las dos variables, confirmándose la hipótesis planteada.

- El estudio de la actividad microbiana tuvo por objetivo evidenciar algún tipo de influencia que pudieran ejercer las hormonas sobre la degradación de la materia orgánica. En el suelo Chicauma, se observó una tendencia clara del aumento de la actividad microbiana en el suelo tratado con biosólido enriquecido, comparado con el suelo tratado con biosólido natural. No así en el suelo Lo Prado, donde no se apreciaron diferencias sustanciales entre el suelo tratado con biosólido enriquecido y el suelo tratado con biosólido natural.

- Para efectos de la incidencia que podrían tener las hormonas sobre el ciclo del nitrógeno, no hubo mayores diferencias entre el suelo tratado con biosólido natural y el suelo tratado con biosólido enriquecido.

V. REFERENCIAS

- Anderson John P., Methods of Soil Analysis. Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. 1982. Madison, Wisconsin USA. 41:831-845.
- Azzouz, A., Souhail, B., & Ballesteros, E. 2010. Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography. A*, 1217(17), 2956–2963.
- Azzouz, A., & Ballesteros, E. 2012. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *The Science of the Total Environment*, 419, 208–215.
- Beck, J., Totsche, K., & Kögel-Knabner, I. 2008. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 71(5), 954–960.
- Building, M., & Kingdom, U. 2002. Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(2), 445–450.
- Caicedo, P., Schröder, A., Ulrich, N., Schröter, U., Paschke, A., Schüürmann, G., Richter, P., Ahumada, I. 2011. Determination of lindane leachability in soil–biosolid systems and its bioavailability in wheat plants. *Chemosphere*, 84(4), 397–402.
- Cantarero R. 2014. Estudio de adsorción de 17 α -etinilestradiol y triclosán en suelos tratados con biosólido y determinación de la fracción biodisponible de los compuestos a través de plantas de trigo. Tesis de Magíster en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Chenxi, W., Spongberg, A., & Witter, J. 2008. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 73, 511–518.

- Chu, S., & Metcalfe, C. 2007. Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1164(1-2), 212–218.
- CIREN, 1996. Estudio agrológico Región Metropolitana. Descripciones de Suelos Materiales y Símbolos. Publicación CIREN N°115. Tomo 1. pp 69 y 197.
- Clarke, B., & Smith, S. 2011. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, 37(1), 226–247.
- Contreras E., 2009. Biodisponibilidad de metales traza en suelos tratados con distintas dosis de biosólido. Uso de plantas de Ballica como bioindicador. Memoria (Químico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Contreras H. 2001. Ciclodextrinas. Naturaleza, propiedades y aplicaciones. Universidad de Guadalajara, Departamento de Madera, Celulosa, y Papel. Academia de Química. pp 12-27
- Corrotea Y. 2013. Determinación de la fracción biodisponible de triclosán en suelos tratados con biosólido a través de la extracción con ciclodextrina como método predictivo y plantas de trigo para su validación. Tesis de Magíster en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Crampon, M., Bodilis, J., Le Derf, F., & Portet-Koltalo, F. 2016. Alternative techniques to HPCD to evaluate the bioaccessible fraction of soil-associated PAHs and correlation to biodegradation efficiency. *Journal of Hazardous Materials*, 314, 220–229.
- Decreto Supremo N°004. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas. 28/10/2009. <http://www.leychile.cl/navegar/?idNorma=1007456&idversion=2010-04-26&idParte>
- Del Valle, E. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046.

- Delaune, P., & Moore, P. a. 2013. 17 β -estradiol in Runoff as Affected by Various Poultry Litter Application Strategies. *The Science of the Total Environment*, 444, 26–31.
- Epstein E. 2003. Land application of sewage sludge and biosolids. Lewis Publishers. CRC Press LLC, USA.
- Flores Y., 2010. Remoción de esteroides estrogénicos y patógenos en aguas residuales municipales mediante un biorreactor aerobio con membranas. Tesis para optar al grado de Maestro en Ingeniería Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería Campus Morelos.
- Goto, T., & Hiromi, J. 2003. Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1-6), 139–142.
- Hansen, P., Dizer, H., Sherry, J., McMaster, M., & Blaise, C. 1998. Vitellogenin a biomarker for endocrine disruptors. *Trend in Analytical Chemistry*, 17(7), 448–451.
- Holloway, R., & Kingdom, U. 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(8), 1792–1797.
- Jackson M.L 1970. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. p 1002.
- Janet, M., Adriana, G., Soto, M., Iván, J., Omar, U., & Gutiérrez, D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2), 52–73.
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J., Shah, A., Cai, Q., Morse, A., & Anderson, T. 2010. Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 257–273.

- Kim, W. 2011. Biodegradation of Bisphenol-A and 17 β -estradiol in Soil Mesocosms Under Alternating Aerobic/ Anoxic/ Anaerobic Conditions. University of South Florida. pp 17-49.
- Lucas, S., & Jones, D. 2006. Biodegradation of estrone and 17 β -estradiol in grassland soils amended with animal wastes. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2803–2815.
- Núñez V., 2011. Caracterización fisicoquímica y determinación de metales pesados en aguas de poro de sedimentos fluviales. Unidad de investigación para el grado de Licenciatura en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias.
- Pob, B. 1995. Induction of phytoestrogen production in *Medicago sativa* leaves by irrigation with sewage water. *Environmental and Experimental Botany*, 35(3), 363–369.
- Prosser, R., & Sibley, P. 2015. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environment International*, 75, 223–33.
- Purdom, C. E., Hardiman, P.A., Bye, V. V. J., Eno, N. C., Tyler, C. R., & Sumpter, J. P. 1994. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*, 8(4), 275–285.
- Rocco, G., Toledo, C., Ahumada, I., Sepúlveda, B., Cañete, A., & Richter, P. 2008. Determination of polychlorinated biphenyls in biosolids using continuous ultrasound-assisted pressurized solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1193(1-2), 32–36.
- Sadzawka A. Carrasco M., Grez R., Mora M., Flores H., Neaman A. 2006. *Métodos de Análisis recomendados para suelos de Chile. Revisión 2006.* Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA - N° 34, Santiago, Chile.
- Sadzawka A., Zagal E. 2007. *Protocolo de Análisis para suelos y lodos.* Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chillán. Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena del Suelo por encargo del Servicio Agrícola Ganadero.



- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C., Maack, G., Pascoe, D., Wenzel, A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates : report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 302–314.
- Segner, H., Navas, J., Scha, C., & Wenzel, A. 2003. Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and in life cycle tests with zebrafish in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 315–322.
- Silva, C., Otero, M., & Esteves, V. 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environmental Pollution*, 165, 38–58.
- Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. 2001. *Principios De Análisis Instrumental*. Quinta edición. Editorial Mc Graw Hill. pp 778, 779, 780.
- Stashenko, E., & Martínez, J. 2010. GC-MS: Más de un Analizador de Masas, ¿para qué?, *Scientia Chromatographica*, 2 (4). 25–48.
- Stumpe, B., & Marschner, B. 2010. Waste effects on the behavior of 17 β -estradiol, estrone, and 17 α -ethinylestradiol in agricultural soils in long- and short-term setups. *Journal of Environmental Quality*, 39(3), 907–916.
- Tran, N., Hu, J., & Ong, S. 2013. Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC-MS/MS and isotope dilution. *Talanta*, 113, 82–92.
- Weigel, S., Kallenborn, R., & Hühnerfuss, H. 2004. Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1023(2), 183–195.
- Wong, F., & Bidleman, T. 2010. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as non-exhaustive extractant for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in muck soil. *Environmental Pollution*, 158(5), 1303–1310.
- Wu, X., Dodgen, L., Conkle, J., & Gan, J. 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. *The Science of the Total Environment*, 536, 655–666.

- Xu, J., Wu, L., Chen, W., & Chang, A. C. 2008. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202, 189–195.
- Yang, Y., Gray, J., Furlong, E., Davis, J., Revello, R., & Borch, T. 2012. Steroid Hormone Runoff from Agricultural Test Plots Applied with Municipal Biosolids. *Environmental Science and Technology*, 46, 2746-2754.
- Ying, G., Kookana, R., & Ru, Y. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment, *Environment International*, 28, 545–551.
- Ying, G., & Kookana, R. 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International*, 33(2), 199–205.
- Ying, G., Kookana, R., Kumar, A., & Mortimer, M. 2009. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. *The Science of the Total Environment*, 407(18), 5147–5155.
- Ying, G., Yu, X., & Kookana, R. 2007. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environmental Pollution*, 150(3), 300–305.
- Zhang, K., & Zuo, Y. 2005. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide. *Analytica Chimica Acta*, 554(1-2), 190–196.

VI. ANEXOS

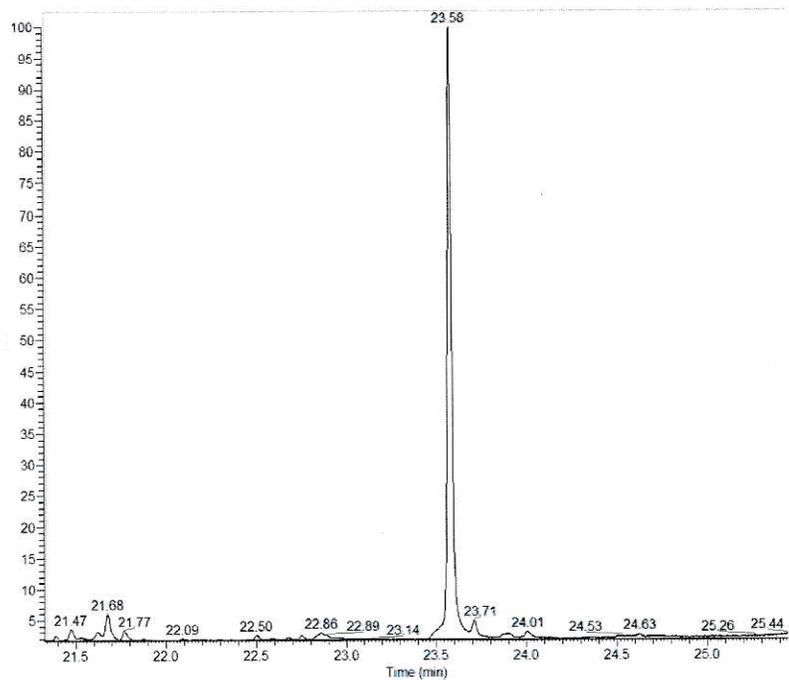


Figura 25: Señal cromatográfica de E1 derivatizada con MSTFA/piridina (1:1)

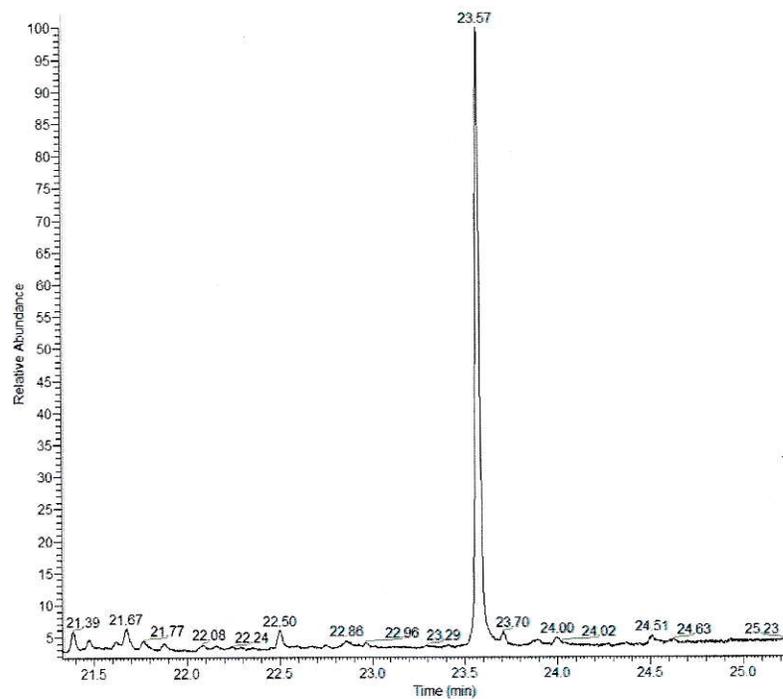


Figura 26: Señal cromatográfica de E1 derivatizada con MSTFA.

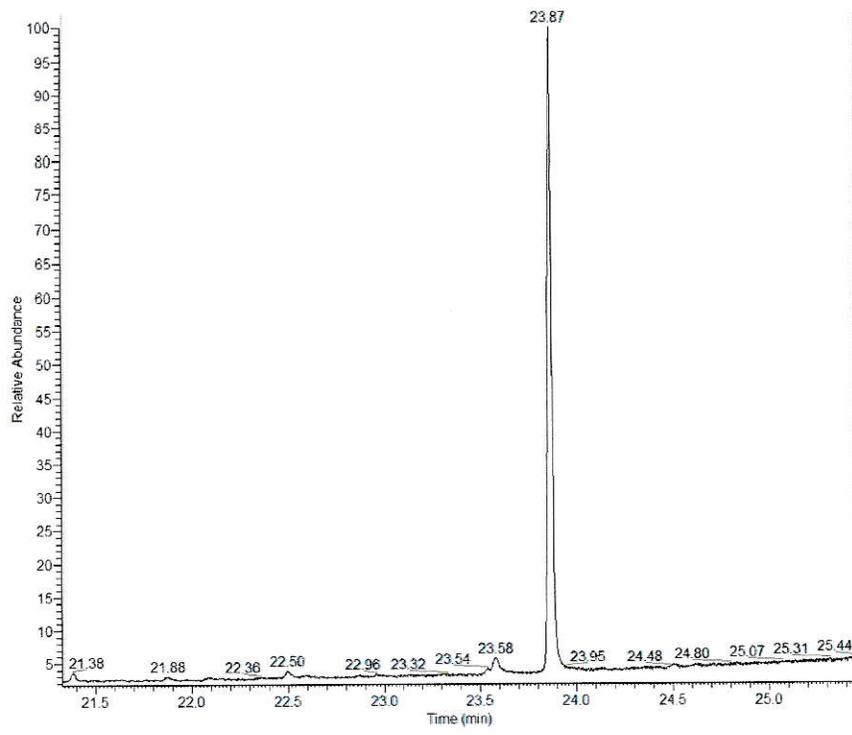


Figura 27: Señal cromatográfica de E2 derivatizada con MSTFA/piridina (1:1)

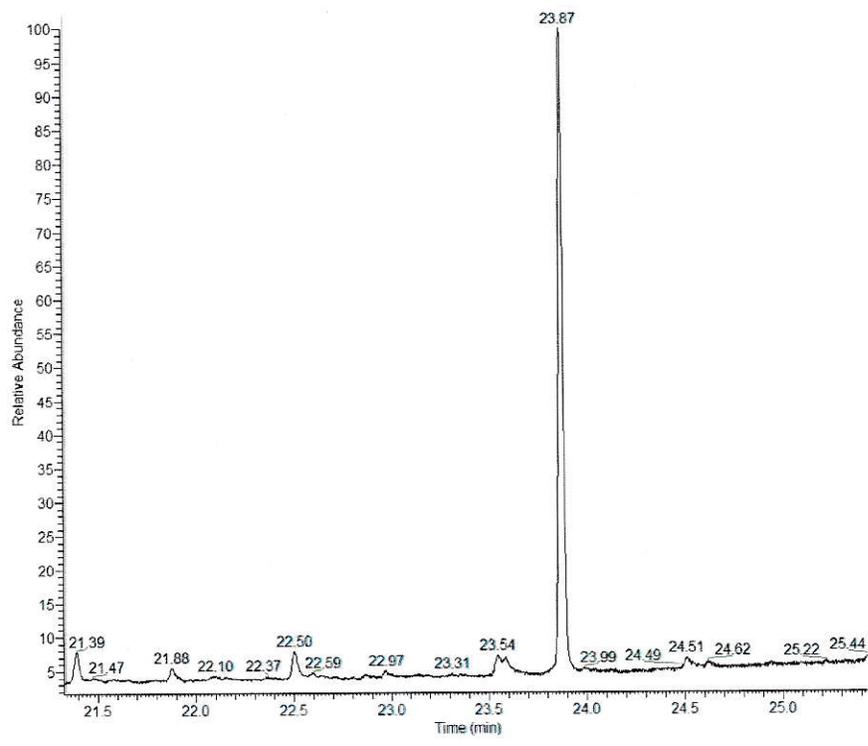


Figura 28: Señal cromatográfica de E2 derivatizada con MSTFA.

Tabla 13. Cálculo para el tratamiento de suelo con biosólido en 90 Mg ha^{-1} .

Suelo	Densidad aparente (kgm $^{-3}$)	Volumen (m 3)	Peso (kg)
Chicauma	1220	2000	2440000
Lo Prado	1190	2000	2380000

Tabla 14. Corrección mediante factor de humedad.

Suelo	Fh Suelo	Fh Bios	Dosis Bios (kg)	Biosólido con Fh (kg)	Suelo con Fh (kg)
Chicauma	1,01	1,12	90000	100800	2464400
Lo Prado	1,01	1,12	90000	100800	2403800

Tabla 15. Peso húmedo de suelo y biosólido utilizado en cada maceta para plantar trigo.

Suelo	Peso suelo (kg)	Peso Bios (kg)
Chicauma	0,505	0,0209
Lo Prado	0,505	0,0214

Tabla 16. Biomasa de las plantas de trigo.

Suelo	P.A (g)	Raíz (g)	P.A + Raíz (g)
Chicauma	1,77	1,74	3,51
Chicauma B	1,71	1,40	3,11
Chicauma B-E	1,94	1,11	3,05
Lo Prado	1,64	1,70	3,34
Lo Prado B	1,62	1,38	3,00
Lo Prado B-E	2,18	1,34	3,52

Tabla 17. Concentración de hormonas encontradas en plantas de trigo cultivadas en los suelos tratados con 90 Mgha⁻¹ de biosólido natural y enriquecido con 10 mgkg⁻¹ de hormonas E1, E2 y EE2.

Matriz tratada	E1 (µgkg⁻¹)	E2 (µgkg⁻¹)	EE2 (µgkg⁻¹)
Suelo Chicauma	n.d	n.d	n.d
Suelo Chicauma B	n.d	n.d	5,95±0,1
Suelo Chicauma B-E	295±1	318±3	392±2
Suelo Lo Prado	n.d	n.d	n.d
Suelo Lo Prado B	n.d	n.d	5,68±0,1
Suelo Lo Prado B-E	215±13	356±4	410±1
Raíz en suelo Chicauma	n.d	n.d	n.d
Raíz en suelo Chicauma B	n.d	n.d	4,26±0,18
Raíz en suelo Chicauma B-E	n.d	47±3	274±17
Raíz en suelo Lo Prado	n.d	n.d	n.d
Raíz en suelo Lo Prado B	n.d	n.d	3,09±0,03
Raíz en suelo Lo Prado B-E		5±0,2	222±3
P.A en suelo Chicauma	n.d	n.d	n.d
P.A en suelo Chicauma B	n.d	n.d	n.d
P.A en suelo Chicauma B-E		2,50±0,1	11±0,3
P.A en suelo Lo Prado	n.d	n.d	n.d
P.A en suelo Lo Prado B	n.d	n.d	n.d
P.A en suelo Lo Prado B-E	n.d	n.d	9,40±0,5

Tabla 18. Extracción de E1, E2 y EE2 con ciclodextrina (HPCD).

Matriz tratada	E1 (μgkg^{-1})	E2 (μgkg^{-1})	EE2 (μgkg^{-1})
Suelo Chicauma	n.d	n.d	n.d
Suelo Chicauma B	n.d	n.d	5,95±0,1
Suelo Chicauma B-E	295±1,0	318±3,0	392±2,0
Suelo Lo Prado	n.d	n.d	n.d
Suelo Lo Prado B	n.d	n.d	5,68±0,1
Suelo Lo Prado B-E	215±13	356±4,0	410±1,0
HPCD suelo Chicauma	n.d	n.d	n.d
HPCD suelo Chicauma B	n.d	n.d	4,76±0,1
HPCD suelo Chicauma B-E	202±6,0	217±6,0	323±17
HPCD suelo Lo Prado	n.d	n.d	n.d
HPCD suelo Lo Prado B	n.d	n.d	4,09±0,2
HPCD suelo Lo Prado B-E	147±7,0	244±6,0	317±3,0

Tabla 19. Determinación de CO₂ en los suelos tratados con biosólido (mg de CO₂ en 100 g de suelo).

Suelo	Día 1	Día 14	Día 28
Chi B	0,08±2*10 ⁻³	0,13±6*10 ⁻³	0,48±2*10 ⁻³
Chi B-E	0,11±4*10 ⁻³	0,50±2*10 ⁻³	0,86±5*10 ⁻³
LP B	0,40±3*10 ⁻³	0,32±3*10 ⁻³	0,61±4*10 ⁻³
LP B-E	0,40±3*10 ⁻³	0,17±3*10 ⁻³	0,70±6*10 ⁻³

Tabla 20. Determinación de amonio y nitrato en suelos tratados con biosólido.

Suelo	Amonio (mgkg^{-1})	Nitrato (mgkg^{-1})
Chi B	261±12,2	365,23±20
Chi B-E	280±0,7	348,81±12
LP B	194±6,2	641,64±11
LP B-E	243±13,7	710,88±26