



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica  
Laboratorio de Química Ambiental

**“EXTRACTABILIDAD DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS  
DEL TIPO PAHs EN BIOSÓLIDOS Y SUELOS AGRÍCOLAS  
ENMENDADOS POR BIOSÓLIDOS”**

Memoria para optar al Título de Químico

**Profesor Patrocinante:**

MSc. Inés Ahumada T.

**Directores de Memoria:**

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

**Mauricio Andrés Retamal Prado**

Santiago, Chile

2007

*“La vida es aquello que te va sucediendo  
mientras te empeñas en hacer otros planes”.*

*John Lennon.*

## RESUMEN

El tratamiento de aguas servidas genera grandes volúmenes de biosólidos, los cuales tienen un alto contenido de materia orgánica y de macro y micro nutrientes, los cuales podrían utilizarse para mejorar suelos erosionados. La enmienda de suelos con biosólidos puede generar un problema ambiental por los contaminantes presentes en el biosólido, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

Tradicionalmente, para la extracción de PAHs desde matrices sólidas se recurre a la técnica Soxhlet, pero la extracción con solventes presurizados (PSE), ha demostrado tener recuperaciones similares o incluso mejores, en tiempos y volúmenes de solvente significativamente menores.

La muestra fue extraída utilizando una mezcla 1:1 v/v de acetona/diclorometano. El sistema de extracción utilizado (PSE), está compuesto por: una bomba de HPLC, que soporta una presión de hasta 6000 psi; un horno de aluminio, provisto de un controlador de temperatura; y una celda de extracción (columna de HPLC sin relleno (15 x 0,6 cm)), que contiene la muestra y donde ocurre la extracción, además un enfriador ubicado fuera del horno de aluminio y una válvula, que regula el flujo de salida del extracto y la presión del sistema. Las condiciones óptimas, en donde se produjo la máxima extracción fueron a una temperatura de 110 °C y un tiempo de 42 minutos, y las recuperaciones fluctuaron entre 80-100% de los 16 PAHs más tóxicos (USEPA).

Con el método PSE optimizado, se realizaron ensayos de incubación de suelos enmendados con biosólidos y enriquecidos con PAHs para determinar la extractabilidad, labilidad, degradación y/o persistencia de los contaminantes PAHs. Para los ensayos de incubación se utilizaron cuatro suelos, y se enmendaron con una dosis de 30 Mg ha<sup>-1</sup> de un biosólido enriquecido con PAHs y se incubaron en condiciones de capacidad de campo y a 25°C. En los cuatro suelos, se observó una clara tendencia de degradación de PAHs, para los compuestos de menor peso molecular. Para los compuestos de 5 y 6 anillos, se observó una menor degradación de estos compuestos. Con estos resultados, se puede concluir que los niveles de concentración de PAHs disminuirán en el tiempo por degradación, disminuyendo así su efecto tóxico.

**Extractability of organic pollutants like PAHs in biosolids  
and amended agricultural soils by biosolids.**

**ABSTRACT**

The waste water treatment produces great volumes of biosolids, which have a high content of organic matter and macro and micro nutrients. This substrate could be used to improve degraded soils. The soil amendment with biosolids can generate an environmental problem by the polluting agents present in the biosolid, such as the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Traditionally, the extraction of PAHs from solid matrices is carried out by Soxhlet. Modern extraction techniques, such as pressurized solvent extraction (PSE), has demonstrated to have similar or even better recoveries, involving extraction times and solvent amounts significantly lower.

The sample was extracted using a solvent mixture of 1:1 v/v acetone/dichloromethane. The extraction system used (PSE), consist of: a HPLC pump, that supports a pressure up to 6000 psi; an aluminum oven, provided with a temperature controller; and an extraction cell (unfilled HPLC column (15 x 0.6 cm)), which contains the sample and where the extraction process occurs, in addition a cooler located outside the aluminum oven and a valve, that regulates the flow of the extract and the pressure of the system were used. The optimal conditions, for extraction were a temperature of 110 °C and an extraction time of 42 minutes, and the recoveries ranged between 80-100% for the 16 PAHs studied.

The soil samples were amended with biosolids (enriched with PAHs) and incubated in order to determine the extractability, lability and persistence of the PAHs polluting agents. For the incubation tests four soils were used and they were amended with a 30 Mg ha<sup>-1</sup> dose of enriched biosolid and they were incubated in conditions of field capacity and to 25°C. In all soils, a clear tendency of degradation of PAHs was observed, for compounds of smaller molecular weight. For compounds of 5 and 6 aromatic ring, a smaller degradation was observed. With these results, we can conclude that the levels of PAHs concentration will diminish in the time by degradation.

## *AGRADECIMIENTOS*

Quisiera en primer lugar, dar las gracias a Dios, por permitirme ingresar a la carrera de Química y darme la inteligencia necesaria para desarrollarme en mis estudios en esta carrera, a la que le tengo tanto cariño, durante todo este tiempo.

Darle las gracias a los proyectos FONDECYT 1030005 y 1050288, por el financiamiento de este memoria.

Agradecer a mis compañeros de generación y a los que se fueron sumando en el camino, por ser como son y no transformar el hecho de ser compañeros en rivales, y en los momentos de felicidad, estudios y amarguras, que estuvieran siempre en el instante preciso para brindar un momento de humor, sin esperar nada a cambio. En especial, agradecer a Felipe, Kenneth, Christian, Paola, Johanna, Germán, y los demás químicos que continúan o ya han egresado, espero que no perdamos el contacto y nos volvamos a encontrar en el futuro.

A Julio, bibliotecario de nuestra Facultad, le agradezco su buena disposición y gestión en la biblioteca, al facilitar los libros a los estudiantes de una forma mágica, ya que nadie sabe como lo hace, pero siempre termina prestándole libros a todos los alumnos que los necesitan, gracias por facilitar la vida a nosotros los estudiantes.

Una mención más que honrosa para los integrantes del Laboratorio de Química Ambiental, por hacerme la vida más fácil y divertida, el convertir el laboratorio en un lugar agradable para trabajar, y por el espíritu de colaboración que existe, muchas gracias a Loreto, Ady, Cristina, Adolfo, Mario, Gabi, y a las personas que han sumado en el camino, que me han ayudado en el desarrollo de mi tesis.

Al Centro de Estudios para el Desarrollo de la Química, le agradezco el permitirme utilizar sus instalaciones, en especial a Betsabét y Carla, por su disposición y paciencia para enseñarme a emplear los equipos de cromatografía gaseosa.

A mis directores de Tesis, les estoy muy agradecido. Al profesor Pablo Richter, le agradezco sus enseñanzas, en la práctica de “la paciencia en la ciencia siempre lleva a buenos resultados”, por su buena disposición y apoyo en todo momento, y principalmente por su buen sentido del humor. A la profesora Inés Ahumada, le agradezco toda la confianza que depositó en mi persona, permitiéndome desarrollarme plenamente como investigador, por su paciencia, por su apoyo, el cariño que le brinda a sus estudiantes, su preocupación, y el respaldo que permite el buen desarrollo de una investigación.

Quisiera hacer una mención especial para mis amuletos de la buena suerte, mis sobrinos Christopher y Nicolás, por brindarme momentos de felicidad y por hacer mi vida menos complicada y más alegre.

Por último, quiero agradecer a mi familia, que siempre me apoyo de una u otra forma, a mis tíos y primos. A mis abuelos que ahora me cuidan desde el cielo, a mi abuelita que con sus oraciones siempre está pendiente de sus nietos. A mi hermana Paula, por ayudarme en momentos difíciles, muchas gracias por tu apoyo en el momento necesario. Y finalmente, quiero darle las gracias a una persona muy especial en mi vida, a la persona que se ha esforzado día a día por sus hijos, y facilitarles el diario vivir, por sus cuidados y afecto, quiero agradecerle a mi madre Sara, ya que sin su apoyo y amor, me habría sido muy difícil finalizar mis estudios.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Origen de los lodos sanitarios**

La construcción de las plantas de tratamiento de aguas servidas en la Región Metropolitana proyecta una cobertura de casi un 100% al año 2010, lo que representa un mejoramiento de la calidad de agua de muchos cursos fluviales con el consiguiente beneficio sanitario y agrícola. Debido a esto, se generan grandes volúmenes de biosólidos, surgiendo un nuevo problema ambiental. En la actualidad, los biosólidos generados en las plantas de tratamiento de aguas servidas, son dispuestos en monorellenos construidos especialmente para ese fin, mientras se estudian vías alternativas de uso. Estos lodos o biosólidos tienen un alto contenido de materia orgánica y un importante contenido de macro y micro nutrientes necesarios para las plantas; sin embargo, los biosólidos pueden contener contaminantes inorgánicos, orgánicos y agentes patógenos.

### **Características de los lodos**

El destino final de biosólidos puede ser como recurso para fertilizar suelos agrícolas o como residuo para rellenos sanitarios. Por su característica de mejorador de suelos, en países europeos se han utilizado en suelos agrícolas, forestales y con el fin de restaurar suelos degradados (Castro, 2007). Sus beneficios en la agricultura son varios, por su contenido de macro y micro nutrientes puede ser utilizado como una alternativa o complemento a fertilizantes químicos, y por su alto contenido de materia orgánica puede ser un recurso destinado a prevenir la erosión, ya que mejora la estructura del suelo, el drenaje, la porosidad y la retención de agua (Epstein, 2003).

Los componentes del biosólido están determinados por el origen de las aguas servidas y su tipo de tratamiento. Entre sus componentes, el de mayor abundancia corresponde a materia orgánica, en relación a compuestos inorgánicos y a microorganismos. El componente orgánico esta constituido por compuestos tóxicos y no tóxicos, estando los tóxicos en menor cantidad, encontrándose compuestos muy

diversos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), plaguicidas, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos (PCDD/F), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles y surfactantes (USEPA, 1999).

Cuando el biosólido es aplicado al suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser liberados a la atmósfera, retenidos en el suelo, lixiviados a través de la fase líquida del suelo, degradado biológica o químicamente, absorbido por las plantas, bioacumulados en organismos. El riesgo ambiental de los compuestos orgánicos contenidos en el biosólido aplicado al suelo, depende de los siguientes factores: a) su concentración, b) su persistencia, c) su habilidad para ser incorporado en la cadena trófica, d) su labilidad y e) su biotoxicidad (Epstein, 2003).

### **Presencia de los PAHs en el biosólido**

Una parte del componente orgánico del biosólido generado, lo conforman los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos muy persistentes que se acumulan en los biosólidos, que a través de éstos, pueden ser transferidos a los suelos agrícolas. Se sabe que una fracción considerable de los PAHs en suelos tratados con biosólidos es retenida por la materia orgánica y en menor grado por la fracción inorgánica del suelo (Northcott y Jones, 2001). Generalmente estos contaminantes presentan persistencia a la degradación, y además de otros como PCBs, pueden llegar a las aguas servidas a través de la vía aérea, efluentes industriales o pueden formarse en el transcurso del tratamiento de las aguas servidas. Por su naturaleza lipofílica, estos compuestos son preferentemente retenidos en la fase sólida del biosólido y a través de su aplicación pueden llegar al suelo y permanecer por meses e incluso años, debido a sus lentas velocidades de biodegradación (Wilson et al., 1997).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuidas en el medio ambiente, que se caracterizan por contener dos o más anillos de benceno unidos entre sí. Los PAHs son sustancias lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento del peso molecular, e inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz (Albers, 1995).

## **Origen de los PAHs**

Existe una gran variedad de fuentes naturales de PAHs, entre ellas principalmente los incendios forestales. Las principales fuentes antropogénicas son en orden decreciente de importancia: procesos industriales, calefacciones domésticas, fuentes móviles de emisión (transportes), incineradoras y plantas de generación eléctrica (Stellman, 1998).

Una completa combustión de materia orgánica daría como resultado la obtención de dióxido de carbono y de agua. Esto tendría lugar en condiciones de alta temperatura y suficiente oxígeno. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, el oxígeno no está en las cantidades necesarias para garantizar esta reacción de forma totalmente eficaz, y como consecuencia algunos fragmentos orgánicos, reaccionarán con otros cercanos pudiéndose formar una gran variedad de PAHs dependiendo de las condiciones que existan en ese momento, así la formación de PAHs se verá más favorecida en la medida que el oxígeno este menos disponible en la reacción de combustión.

## **Propiedades físicas y químicas de los PAHs**

A temperatura ambiente, los PAHs se encuentran en estado sólido. Las características comunes de estas sustancias son el alto punto de fusión y ebullición, baja presión de vapor y baja solubilidad en agua, la cual decrece al aumentar el peso molecular. Estos compuestos son solubles en solventes orgánicos, y al ser lipofílicos, son bioacumulados y concentrados en sedimentos y suelos, en función de su persistencia, que aumenta al aumentar el peso molecular (Albers, 1995).

Desde el punto de vista químico, los PAHs son estables. En la atmósfera pueden experimentar reacciones de fotodescomposición y reacción con óxidos de nitrógeno, óxidos nitrosos, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ozono y radicales hidroxilo (Berg, 1995).

La principal vía de degradación de estos compuestos incluye procesos químicos, fotolíticos o metabólicos. Entre los procesos químicos se incluyen la cloración y ozonización del agua, entre los fotolíticos la acción conjunta de la luz solar y el oxígeno (Yao, 1998).

### Toxicidad de los PAHs

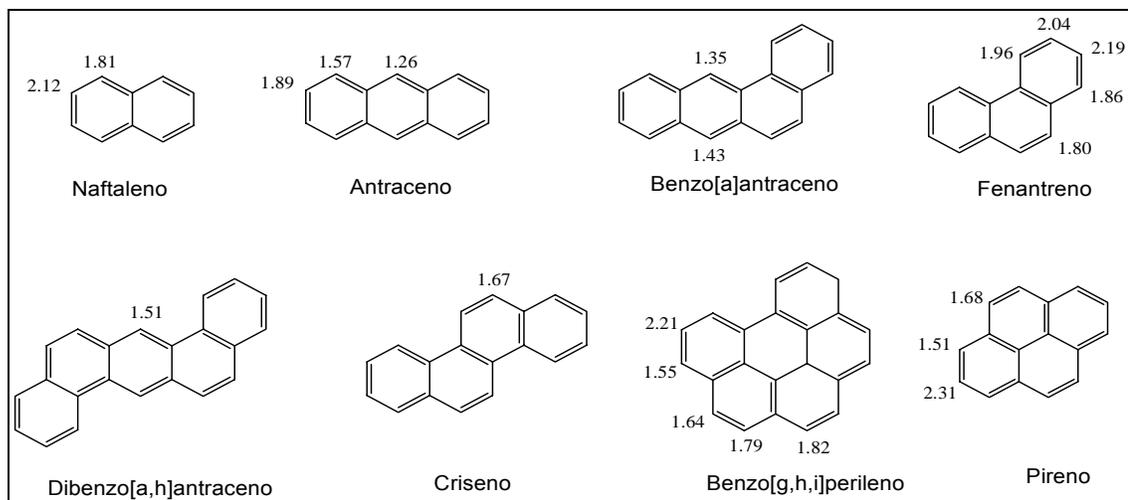
La toxicidad de muchos PAHs, al menos en roedores empleados como animales de experimentación, suele ser baja (dosis letal para el 50% de la población es superior a 50 mg/kg en peso vivo). Desde este punto de vista, resultan menos peligrosos que los insecticidas o acaricidas que se comercializan. Sin embargo, la gran diferencia está en los efectos a mediano y largo plazo que producen algunos PAHs, existiendo una veintena de estos compuestos que han demostrado una actividad cancerígena, mutagénica o inmunosupresora, lo cual se puede apreciar en la Tabla 1 (Koss, 1999). La genotoxicidad de los PAHs depende en gran medida de su estructura. Entre los más peligrosos destacan los derivados del antraceno, aunque éste no lo es, sí lo son aquéllos que poseen un anillo bencénico más, como benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno.

**Tabla 1. Datos relativos a los efectos cancerígenos, genotóxicos y mutagénicos de algunos PAHs**

PAHs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluoreno	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo[e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibenzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo[g,h,i]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

S=suficiente; I= insuficiente; N= no cancerígenos; L= limitados  
 Mutagenicidad (test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso)

El alto poder cancerígeno de estos compuestos, se debe a que poseen una región en su estructura con una elevada energía de deslocalización de electrones, que permiten interactuar con los enlaces covalentes (Spivack, 2001), como se muestra en la figura 1.



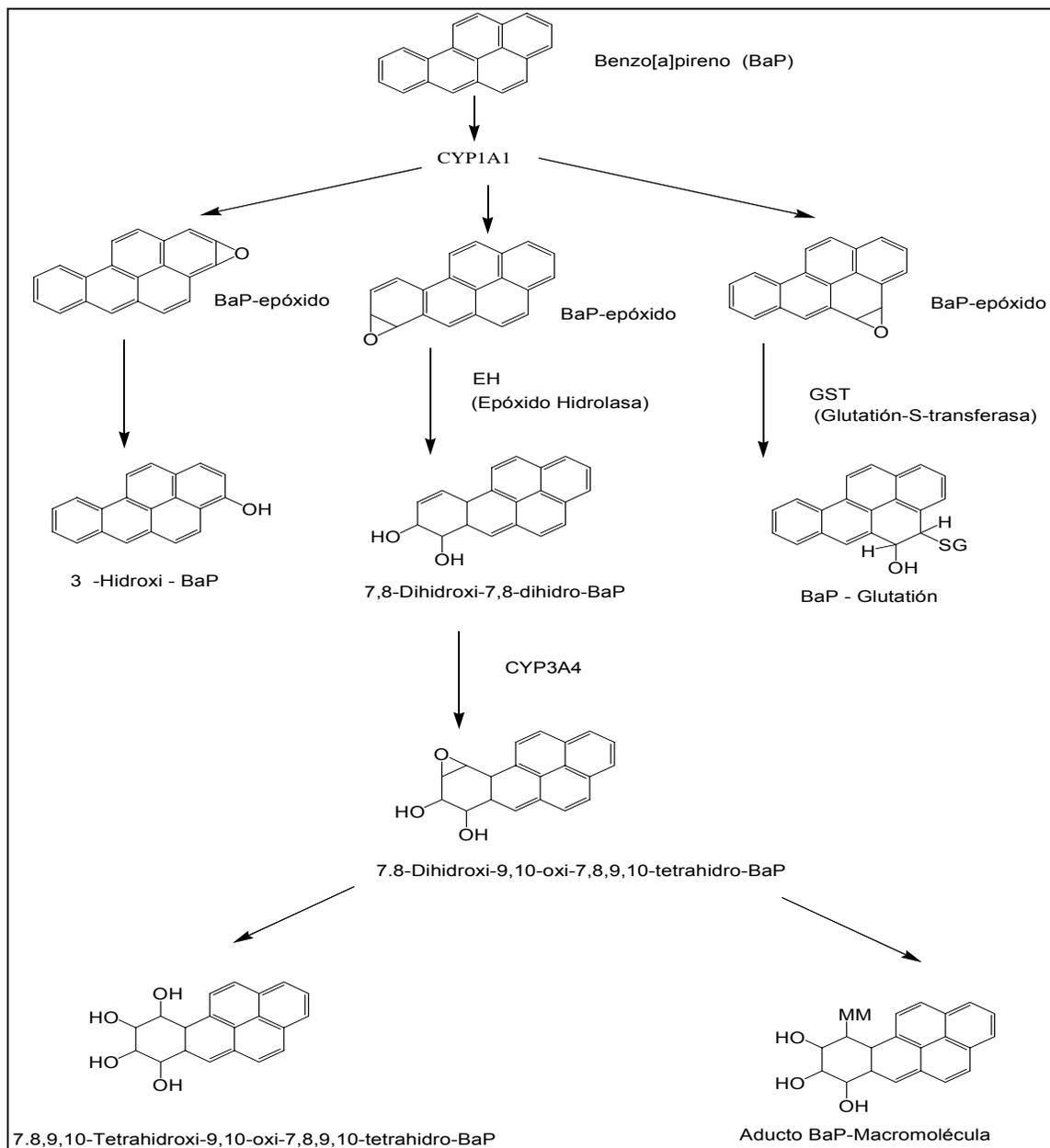
**Figura 1. Energía de deslocalización de electrones en PAHs basado en el trabajo de Zander.**

La exposición humana se produce por medio de la inhalación o ingestión de estos compuestos. Tras la absorción, se distribuyen entre diversos órganos y tejidos, en especial los ricos en lípidos. Una vez incorporados al organismo, experimentan una oxidación enzimática mayoritariamente en el hígado, que los transforma en epóxidos y dihidrodioles. Estas especies químicas constituyen la especie genotóxicamente activa de los PAHs, las cuales pueden formar aductos con proteínas y ácidos nucleicos (Koss, 1999).

### **Acción de los PAHs en el organismo humano**

La biotransformación de los PAHs involucra una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que son el grupo de enzimas del citocromo P450, que son capaces de convertir los compuestos xenobióticos lipofílicos en compuestos solubles en agua. Estos sistemas enzimáticos están distribuidos en todo el organismo, y son estimulados en el organismo al ser expuestos a estos compuestos lipofílicos persistentes (Mastandrea, 2005).

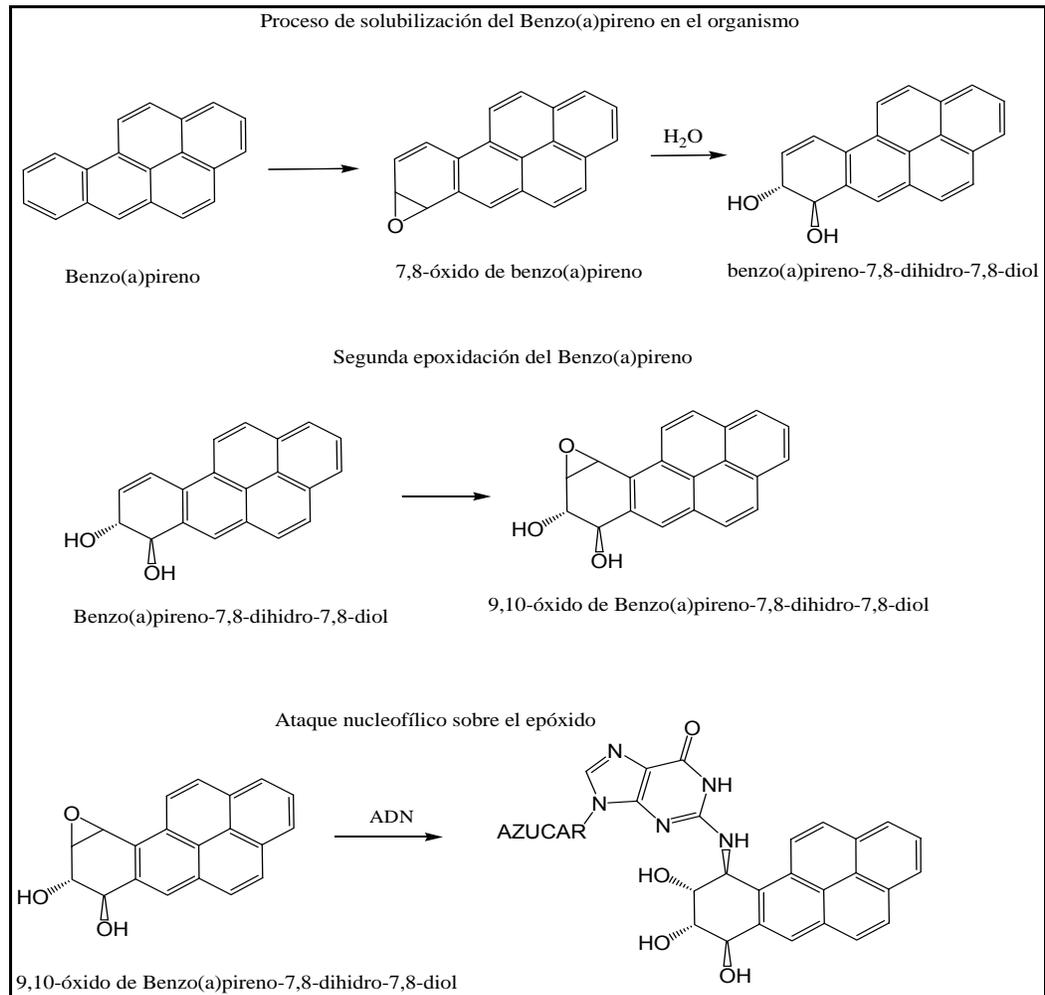
Las enzimas responsables de la activación metabólica de los PAHs son mutuamente la CYP1A1, CYP1B1 y en menor grado, la CYP1A2 conjuntamente con la epóxido hidrolasa (Keith, 2001). Las enzimas CYP1A1 y CYP1B1 se encuentran ampliamente distribuidas en el pulmón humano. En la figura 2 se representa la ruta metabólica del benzo(a)pireno abreviado como BaP:



**Figura 2. Ruta metabólica del benzo(a)pireno en el organismo.**

Las monoxigenasas dependientes del citocromo P-450 (CYP1A) son responsables de la oxidación enzimática de los PAHs. Ellas actúan sobre una zona de elevada densidad electrónica de la molécula de PAH, formando epóxidos que pueden espontáneamente formar fenoles, o por acción de las epóxido hidrolasas, producir dihidroles (Spivack, 2001).

De estos fenoles, algunos son oxidados a quinonas y otros producen epóxidos secundarios (dihidrodiolépóxidos), que son las formas más reactivas con el ADN. El carbono benzílico de los dihidrodiolépóxidos es capaz de reaccionar con las especies nucleofílicas del ADN, fundamentalmente con guanidina, y eventualmente iniciar un proceso mutagénico. Reacciones similares se observan con otras macromoléculas como albúmina y la hemoglobina (Mastandrea, 2005). La figura 3 muestra el proceso que experimenta benzo(a)pireno en el organismo y su reacción con el ADN.



**Figura 3. Proceso de solubilización del benzo(a)pireno en el organismo.**

Los fenoles, las quinonas y los dihidrofenoles, reaccionan con ácido sulfúrico y glucurónico, y pueden sufrir conjugación formando sulfatos y glucuronatos. Las quinonas y los diepóxidos también pueden reaccionar con el glutatión (mediante una glutatión-S-transferasa) y pueden ser eliminados por la orina como tioéteres, el mecanismo no se conoce con exactitud (Mastandrea, 2005).

## **Degradación de PAHs**

La degradación metabólica de PAHs es muy lenta en el subsuelo, debido a que en ellos y en sedimentos hay menos oxígeno y luz. Los PAHs mas pesados (4 a 6 anillos) son mas persistentes que los mas pequeños (2 a 3 anillos) (Conte, 2000). Los mecanismos de destrucción de PAHs son principalmente químico y biológico, e incluyen biodegradación, oxidación abiótica, hidrólisis, destrucción UV en la superficie (Basel, 2002). La biodegradación de PAHs depende principalmente de su biodisponibilidad. Esta biodisponibilidad depende de la cercanía de los microorganismos a los sitios en donde se encuentran sorbidos los PAHs en el suelo. Algunos microorganismos producen biosurfactantes que favorecen la desorción de PAHs desde la materia orgánica del suelo, ya que solubilizan de cierta forma a éstos compuestos, aumentando su biodisponibilidad, y por ende, pueden biodegradar a estos compuestos, siendo éste el paso fundamental para que se inicie el proceso de biodegradación, porque si los microorganismos no tienen biodisponibles a los PAHs, no pueden degradarlos (Voparil, 2000).

## **Lixiviación de analito**

Considerando la complejidad y número de interacciones analito-matriz que ocurren tanto en el suelo como en lodos, desde un punto de vista analítico es posible establecer que la operación de extracción del analito de la muestra, constituye claramente la etapa de mayor riesgo frente a la obtención de datos de calidad analítica. La metodología convencional de extracción se basa en el uso de la extracción con solvente incorporando agitación o Soxhlet. Aún, cuando estas metodologías se consideran “cuantitativas”, presentan limitaciones y, en muchos casos, dependiendo de la matriz, sólo una fracción del analito puede ser extraída, quedando residuos de éste, fuertemente retenidos en la fase sólida (matriz), que no son extraídas bajo estas condiciones (Northcott y Jones, 2001).

## **Técnicas de extracción**

La extracción y recuperación de un analito desde una matriz sólida puede resumirse en cinco etapas: desorción de los compuestos desde los sitios activos de la matriz, difusión en la matriz misma, solubilización del analito en el extractante, difusión del analito en el extractante y recolección del extracto fresco. Para obtener recuperaciones reproducibles y cuantitativas, se requiere un adecuado control y optimización de cada paso (Camel, 2001).

### **a) Extracción Soxhlet:**

Las técnicas de extracción con solvente más tradicionalmente utilizadas son la extracción Soxhlet y la extracción asistida por sonicación. En estas extracciones, son necesarios grandes volúmenes de extractante, 300 mL para Soxhlet y 100 mL para la sonicación con 2 repeticiones (EPA METHOD 3540C y 3550B) y largos tiempos de extracción, además de bajas temperaturas de trabajo (50°C aproximadamente). Además, el extracto final requiere de subsecuentes concentraciones y una limpieza (*clean-up*) para el posterior análisis, y filtración para el caso de la sonicación, lo que puede causar pérdidas o contaminación. Durante la última década, han emergido nuevas técnicas de extracción más eficientes que podrían reemplazar a las tradicionales.

### **b) Extracción Asistida por Microondas (MAE):**

En la extracción asistida por microondas (MAE), se emplea energía de microonda no ionizante (frecuencia de 300-300000 MHz) que provoca movimiento molecular por migración de iones y rotación de dipolos. La rotación de dipolo se refiere al alineamiento, debido al campo eléctrico, de moléculas que presentan momento dipolar permanente o inducido en el solvente y la muestra. Con la disminución de la intensidad del campo, se restaura el desorden térmico con lo cual se libera energía térmica. A 2450 MHz, el alineamiento de moléculas seguida de la vuelta al desorden ocurre  $4,9 \times 10^9$  veces por segundo, originándose un rápido calentamiento. Debido a este

efecto en particular, las radiaciones de microondas causan en la materia, un rápido calentamiento que facilita el proceso de extracción de analitos en la muestra, pero con la aplicación de altas radiaciones de microondas, el calor resultante puede provocar la degradación del analito (V. López-Ávila, 1996).

### **c) Extracción con Fluidos Supercríticos:**

En la extracción con fluidos supercríticos (SFE), el extractante se encuentra en su estado supercrítico, lo que significa que la presión y la temperatura del extractante se encuentra por sobre el valor crítico. Los fluidos supercríticos poseen una propiedad única, se encuentran en un estado intermedio líquido-gas. En particular, su viscosidad es más baja que la de los líquidos, y su coeficiente de difusión es más alto, permitiendo hacer más eficiente la extracción. Además, la densidad puede ser ajustada por cambios en la presión y la temperatura, dando la oportunidad de desarrollar extracciones altamente selectivas (Hawthorne, 2000).

### **d) Extracción con Solventes Presurizados:**

Una nueva técnica apareció hace pocos años, la denominada extracción con solventes presurizados (PSE). Al contrario de la extracción con fluidos supercríticos, la celda en donde se produce la extracción, se mantiene a alta temperatura (100-200°C, rango aplicado a la mayoría de solventes orgánicos) y presión para que el solvente permanezca en estado líquido. Con las altas temperaturas y presión, el solvente puede ser considerado en estado subcrítico, con ventajosas propiedades de transferencia de masa, además de permitir eficientes extracciones, debido al uso de elevadas temperaturas, provocando una disminución de la viscosidad, ayudando a la ruptura de la interacción soluto-matriz e incremento del coeficiente de difusión. Además, las altas temperaturas contribuyen a aumentar la solubilización del analito en el solvente, debido al cambio en el coeficiente de distribución. Finalmente la presión favorece la penetración del extractante en la matriz (Camel, 2001).

Comúnmente, los PAHs han sido extraídos desde muestras sólidas como suelos y biosólidos empleando una extracción Soxhlet, requiriéndose entre 250-500 mL de solvente para realizar la extracción y con una demora entre 16 y 24 horas en una extracción completa, en cambio, con la utilización de PSE el tiempo de extracción y las cantidades de solvente utilizado disminuyen considerablemente (Hawthorne, 2000), lo cual es muy favorable, ya que el solvente utilizado es nocivo para la salud y al disminuir el tiempo de extracción, agiliza el proceso de cuantificación de los analitos.

### **Variables de estudio para la extracción de PAHs desde matrices de biosólidos por PSE.**

Para comenzar con el estudio de extractabilidad de PAHs desde una matriz de biosólido, lo primero que se debe realizar, es definir las variables de estudio que podrán influenciar en la lixiviación. Como se mencionó anteriormente, la variable que más afecta es la temperatura, y obviamente la correcta elección del solvente extractante. Con la elección del solvente, habrá la necesidad también de estudiar otras variables que pueden influir en la lixiviación, como sería el tiempo de extracción dinámico, que se define como el tiempo de extracción en continuo (siempre ingresa a la celda de extracción solvente fresco) y tiempo de extracción estático (no hay flujo, sólo interacción solvente con analito-matriz) y además, el flujo de extracción, que nos entrega la bomba a utilizar, estos factores están íntimamente ligados al solvente, aparte de la temperatura por los siguientes motivos:

- A. El uso de altas temperatura provoca además del incremento en la solubilidad, la ruptura de las interacciones analito-matriz, atracciones dipolo-dipolo u otro tipo de interacción entre el analito y los sitios activos de la matriz. La temperatura puede vencer interacciones cohesivas (analito-analito) y adhesivas (analito-matriz) debido a la disminución en la energía de activación requerida para los procesos de desorción (Perry, 1997).

B. Al introducirse constantemente solvente fresco, se mejora la transferencia de masa, y provoca también un gradiente de concentración desde el seno a la superficie de la matriz, haciendo más eficiente la extracción (Ley de difusión de Fick). Además, con la aplicación de elevadas presiones, se mejoran los coeficientes de difusión, ya que el solvente penetra con mayor facilidad al interior de la matriz, es por esto que es necesario realizar el estudio del tiempo de extracción dinámico, como es un proceso en continuo, permite la rápida separación del analito de la matriz, el tiempo estático influirá en el mayor tiempo de contacto con la matriz, con lo que se espera que influya en lograr situarse en los sitios activos para provocar la desorción del analito, y el flujo de extracción será estudiado debido a que podrá favorecer a flujos mas elevados, a la transferencia de masa y aumentar el gradiente de concentración, trasladando en forma más rápida al analito desde la celda de extracción hasta el tubo recolector (Perry, 1997).

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollo y aplicación de un método de extracción de PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos) desde biosólidos utilizando PSE.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los contaminantes PAHs extraídos por metodologías convencionales (Soxhlet) en biosólido y suelo por técnicas cromatográficas GC-MS.
- Optimizar nuevas metodologías de extracción de PAHs en suelo y biosólido.
- Realizar ensayos de incubación de suelos enmendados con biosólidos y determinar la extractabilidad de los contaminantes PAHs.
- Realizar ensayos de incubación de suelos enmendados con biosólidos enriquecidos con PAHs para determinar su labilidad, degradación y/o persistencia.
- Análisis e interpretación de los resultados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

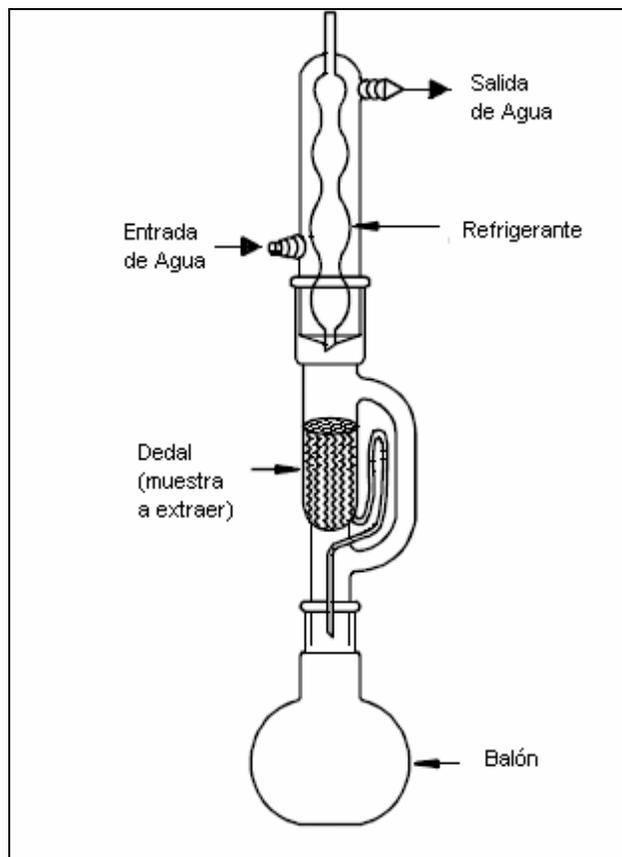
- Acetona Suprasolv de Merck
- Ciclohexano Suprasolv de Merck
- Diclorometano grado HPLC de Fisher Scientific
- Lana de vidrio Silanizada de Chromatography Research Supplies, Inc.
- Pentano, grado pesticida, de Fisher Scientific
- Silica Gel, grado 923, 100 – 200 mesh, de Sigma – Aldrich
- Sulfato de Sodio anhidro, grado PA, de Merck
- Tribromoanisol (TBA)
- Estándar de PAHs: QTM PAH Mix, de 2000 µg/mL en Diclorometano, que contiene acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, pireno, fenantreno, de SUPELCO.
- Material de referencia LGC6182 (Sewage Sludge PAH) con los siguientes compuestos: acenafteno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[a]pireno, criseno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, pireno, fenantreno.

## **Materiales y Equipos**

- Bomba para HPLC modelo Perkin Elmer, serie 200 lc pump
- Conexiones SUPELCO (férulas, tornillos, uniones, fritas)
- Celda de extracción: columna de acero inoxidable HPLC, sin relleno, 15x0.6 cm D.I.
- Horno de Aluminio
- Sistema eléctrico para control de temperatura del horno (rango de trabajo 25-400°C)
- Tubo enfriador de 3 m enrollado de acero inoxidable, SS-316, 1/16", 0.1 mm D.I.
- Válvula de acero inoxidable Swagelok
- Equipo de extracción Soxhlet
- Manto calefactor Bibby Sterilin Ltd
- Equipo de evaporación Kuderna-Danish SUPELCO
- Baño termoregulado GFL
- Refrigerante
- Columnas para secado de muestras
- Soporte múltiple "*Manifold*" de extracción en fase sólida SUPELCO
- Incubador Gallenkamps
- Balanza Analítica 125 A ( $\pm 0.0001$  g) Precisa
- Tubos recolectores de 40 mL
- Viales color ámbar
- Jeringas para cromatografía Hamilton de 10 y 100  $\mu$ L
- Cilindro de N<sub>2</sub> extra puro AGA
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, acoplado a un detector de masa Fisons MD 800.
- Cilindro de Argón extra puro AGA

### Selección del solvente

Para determinar el mejor solvente a utilizar, se extrajo el material de referencia LGC6182 por medio de una extracción Soxhlet (Figura 4) utilizando como solvente diclorometano y una mezcla 1:1 de diclorometano-acetona, y así comparar resultados obtenidos por la metodología de extracción con solventes presurizados PSE, para lo cual, se pesó 3 g de muestra de material de referencia LGC6182, utilizando 250 mL de solvente y se procedió a extraer por 24 horas y a una razón de 4-6 ciclos por hora (USEPA METHOD 3540C).



**Figura 4. Equipo de extracción Soxhlet.**

## Proceso de extracción PSE

Para efectuar el proceso de extracción, se utilizó un sistema de extracción que se esquematiza en la Figura 5. Se introduce la muestra (300 mg aproximadamente) en la celda de extracción, en donde la bomba de HPLC presuriza el solvente a una presión de trabajo de  $1850 \pm 50$  psi. Con el sistema sin filtraciones, se coloca en el horno de aluminio a una determinada temperatura de trabajo y se lleva a cabo la extracción de la muestra en condiciones estática o dinámica. Posteriormente, el extracto pasa por el sistema de enfriamiento (en un tubo enrollado en un baño de agua) y luego llega a la válvula, en donde se procede a coleccionar el extracto en un tubo de 40 mL.

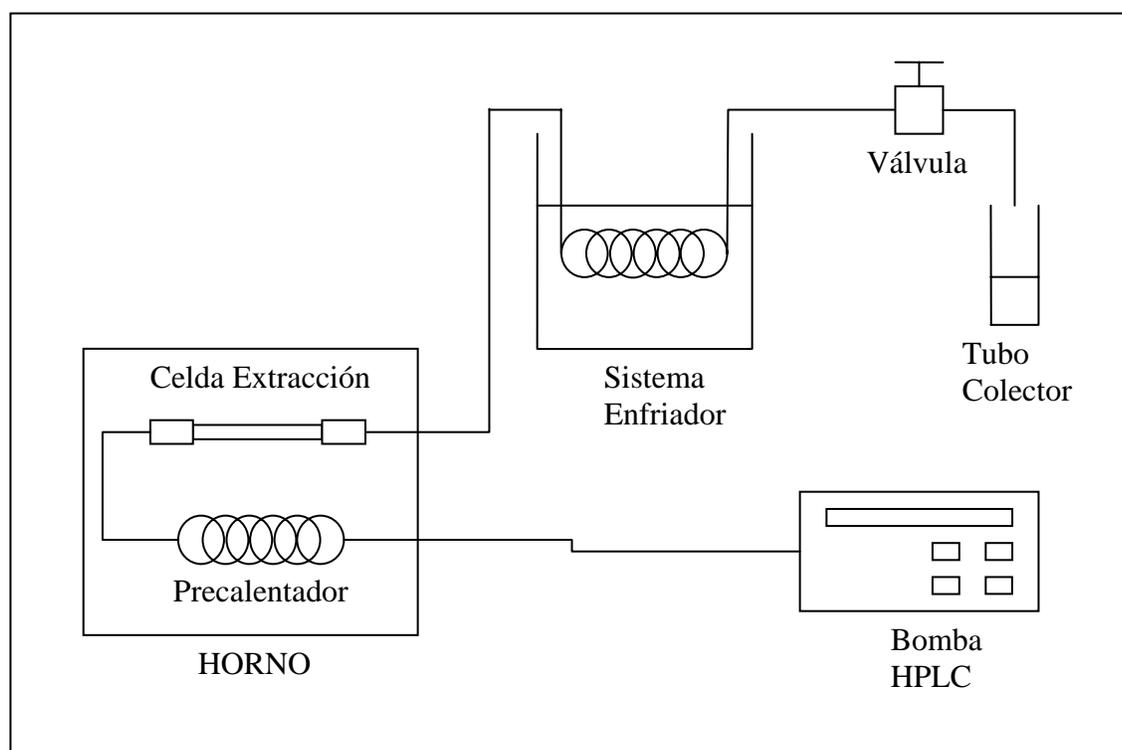


Figura 5. Sistema de extracción PSE.

## Secado y concentración de la muestra

El extracto fresco, es sometido a una etapa de secado en una columna que contiene 10 cm de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, para posteriormente ser llevado a un evaporador Kuderna-Danish (figura 6), sumergido en un baño de agua a  $80^\circ\text{C}$ , para concentrar el extracto a un volumen de 2 mL.

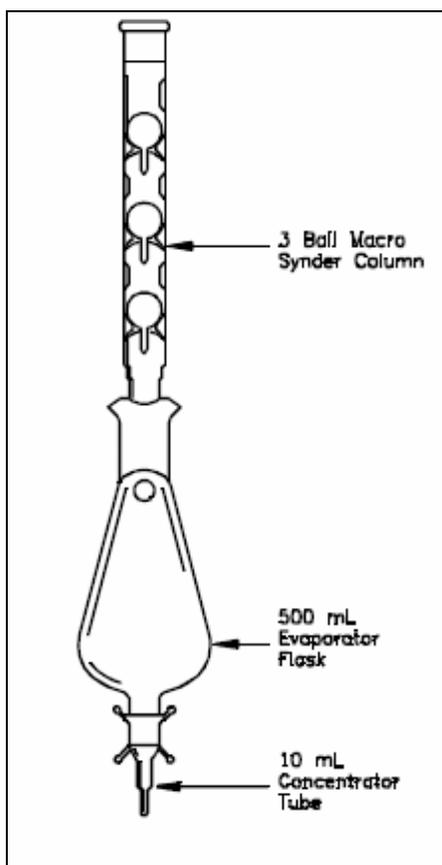


Figura 6. Equipo de concentración Kuderna-Danish.

### **Tratamiento de limpieza del extracto (*clean-up*)**

Luego de la concentración del extracto, éste es sometido a un cambio de solvente en el mismo equipo Kuderna-Danish, a ciclohexano, agregando 20 mL de este solvente al sistema y concentrando a una temperatura por sobre los 100°C, hasta llegar a 2 mL. El extracto en ciclohexano es vertido en una columna (8 cm longitud, 1 cm de diámetro) que contiene 2,5 g de silica gel (disuelto en diclorometano) y 2 cm de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (USEPA Method 3630C). Previo a la etapa de *clean-up*, es cambiado el solvente de la columna, utilizando 20 mL de pentano, posteriormente se adicionan los 2 mL de muestra, lavando con 2 mL de ciclohexano el recipiente que contenía la muestra, y luego se lava con 13 mL de pentano, descartando este volumen.

Finalmente, se eluye con 20 mL de una mezcla 2:3 v/v diclorometano-pentano, provocando la extracción de los PAHs desde la fase sólida, recolectándose en un tubo de 40 mL. Cada extracto ya limpio, es concentrado con un flujo de N<sub>2</sub>, hasta llegar a un volumen de 2 mL.

### **Determinación cromatográfica**

Los extractos ya listos para análisis, se les agrega un estándar interno, Tribromoanisol (TBA) con una concentración en el extracto de 5 µg/mL.

Los parámetros de medición utilizados son:

Temperatura del inyector: 80°C

Temperatura de la fuente: 280°C

Temperatura de la interfase: 280°C

El programa de temperatura utilizado para la cromatografía es:

Temperatura inicial: 80°C

Velocidad de calentamiento 1: 10°C/minuto hasta llegar a 150°C

Velocidad de calentamiento 2: 15°C/minuto hasta llegar a 300°C

Temperatura final: 300°C por 8 minutos

## **Estudio de variables del método. Screening**

Se estudió estadísticamente la influencia de 4 variables (temperatura, flujo de solvente, tiempo estático y dinámico de extracción) que podrían incidir en la eficiencia de la extracción, a través de un diseño fraccionario  $2^{4-1}$  de dos niveles. Para este experimento se utilizó una cantidad de muestra de 300 mg de biosólido y una presión de trabajo del sistema de  $1850 \pm 50$  psi.

## **Optimización del método**

Se optimizó, tomando en cuenta las variables que influyeron significativamente en el proceso de extracción de PAHs a través de la técnica de extracción PSE, utilizando un diseño de Compuesto Central ( $2^N +$  axiales), para ello se pesaron 300 mg de biosólido y una presión de trabajo del sistema de  $1850 \pm 50$  psi.

## **Muestras de suelo y biosólido**

- Muestras reales de biosólidos, de distintas épocas del año, provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales “El Trebal”, tamizadas a 2 milímetros con tamiz plástico.
- Se seleccionaron cuatro suelos agrícolas de la región Metropolitana del orden Mollisol, estos suelos fueron identificados como Coyuncaví Bajo, El Maitén, La Paloma y Miraflores. Estos suelos fueron recolectados desde 0 hasta 20 cm de profundidad, secados y tamizados a 2 mm, para luego ser enmendados con biosólidos para su posterior incubación. En la Tabla 2 se muestran la ubicación y clasificación de los suelos de estudio.

**Tabla 2. Ubicación y clasificación de los suelos.**

Suelos	Ubicación	Coordenadas	UTM*	Serie**	Orden**
El Maitén	Lampa	33° 19' 902"	6.310,338	Lampa	Mollisol
	Camino				
	Lipangue				
	RM	70° 51' 873"	326,464		
La Paloma	Lampa	33° 19' 909"	6.310,361	Lampa	Mollisol
	Camino				
	Lipangue				
	RM	70° 52' 367"	325,398		
Miraflores	Curacaví	33° 24' 418"	6.301,663	Chorombo	Mollisol
	Miraflores				
	RM	71° 04' 745"	306,661		
Coyuncaví Bajo	Curacaví	33° 23' 158"	6.303,918	Pomaire	Mollisol
	Coyuncaví Bajo				
	RM	71° 07' 126"	302,922		

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

### Estudio de labilidad / degradación de PAHs

Las muestras de suelos enmendados con biosólido en una relación de 30 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido para cada suelo, que es la dosis máxima permitida por normas de uso de biosólido para suelos erosionados (CONAMA, 2000), fueron incubados en condiciones de capacidad de campo a 25°C. Además, el biosólido utilizado para la enmienda fue enriquecido con PAHs. Para ello, se pesaron 4,72 g de biosólido, y se adicionó un volumen de diclorometano hasta sobrepasar la altura del biosólido, adicionando posteriormente 10 mL de una solución de 20 µg/mL de cada analito de PAHs, en diclorometano como solvente para luego agitar por 24 horas aproximadamente, para homogeneizar, posterior a este lapso de tiempo, se evaporó el solvente a temperatura ambiente y se enmendó cada suelo con este biosólido enriquecido para posterior estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Elección del solvente

Se realizaron dos extracciones con el sistema Soxhlet, utilizando diclorometano y una mezcla 1:1 de diclorometano-acetona, para evaluar el poder extractante que posee uno u otro solvente. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Extracción Soxhlet de material de referencia utilizando diclorometano y acetona-diclorometano como solventes. Valores en mg/kg.**

PAHs	Extracción con diclorometano	Extracción con diclorometano/acetona
Naftaleno	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,07
Acenaftileno	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Acenafteno	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,07
Fluoreno	0,03 ± 0,02	0,14 ± 0,07
Fenantreno	0,18 ± 0,09	0,70 ± 0,02
Antraceno	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,10
Fluoranteno	0,04 ± 0,02	0,96 ± 0,08
Pireno	0,04 ± 0,02	0,95 ± 0,20
Benzo[a] antraceno	0,06 ± 0,03	0,32 ± 0,06
Criseno	0,06 ± 0,03	0,35 ± 0,10
Benzo[b+k]fluoranteno	0,12 ± 0,07	0,73 ± 0,01
Benzo[a]pireno	0,09 ± 0,05	0,31 ± 0,05
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	ND	0,33 ± 0,01
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	0,24 ± 0,00
Benzo[g,h,i]perileno	ND	0,47 ± 0,00

La mezcla diclorometano-acetona presenta una mejor extracción de PAHs que diclorometano, y es atribuible a la interacción que presenta la acetona con las moléculas de agua adsorbidas en la materia orgánica, permitiendo el paso de la mezcla de solventes a los sitios activos en donde se encuentran absorbidos los compuestos aromáticos, ya que diclorometano por si solo, no es capaz de atravesar esta barrera, debido a su hidrofobicidad. Por lo tanto se seleccionó la mezcla de solventes acetona-diclorometano como el extractante.

## Estudio de variables del método. Screening

Las variables que podrían influir en la extracción PSE son: temperatura del horno, flujo del solvente, tiempo estático y dinámico de extracción. Estos factores fueron estudiados para determinar que variables influirán significativamente en la extracción. Se realizó un diseño experimental de screening, de dos niveles y los cuatro factores mencionados anteriormente, el cual consta de 11 experimentos, que incluyen 3 puntos centrales, que se aprecia en la tabla 4:

**Tabla 4. Condiciones de cada experimento para el estudio de Screening.**

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo estático (min)	Tiempo Dinámico (min)	Flujo Solvente (mL/min)
1	50	0	5	1
2	150	0	5	3
3	50	20	5	3
4	150	20	5	1
5	50	0	30	3
6	150	0	30	1
7	50	20	30	1
8	150	20	30	3
9	100	10	17,5	2
10	100	10	17,5	2
11	100	10	17,5	2

Se estudio los parámetros que influyen en la extracción entre los siguientes intervalos:

Temperatura: 50-150°C

Tiempo estático: 0-20 minutos

Tiempo Dinámico: 5-30 minutos

Flujo de extracción: 1-3 mL/min

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Resultado del diseño fraccionado 2<sup>4-1</sup> de Screening. Valores en razón de áreas entre cada compuesto y el estándar interno.**

PAHs	*1	*2	*3	*4	*5	*6	*7	* 8	* 9	*10	*11
Naftaleno	0,131	0,252	0,147	0,192	0,208	0,319	0,155	0,481	0,182	0,202	0,192
Acenaftileno	0,009	0,016	0,007	0,018	0,016	0,025	0,027	0,037	0,023	0,021	0,022
Acenafteno	0,019	0,081	0,028	0,038	0,045	0,080	0,061	0,110	0,059	0,055	0,057
Fluoreno	0,031	0,145	0,088	0,068	0,072	0,160	0,165	0,213	0,115	0,111	0,113
Fenantreno	0,191	0,934	0,603	0,510	0,596	1,192	1,131	1,642	0,892	0,855	0,874
Antraceno	0,013	0,084	0,048	0,041	0,047	0,115	0,146	0,186	0,095	0,081	0,096
Fluoranteno	0,276	1,452	1,077	0,859	1,871	2,122	2,131	2,907	1,657	1,648	1,653
Pireno	0,347	1,526	1,109	0,923	1,055	2,087	2,165	2,818	1,727	1,676	1,702
Benzo[a]Antraceno	0,111	0,488	0,456	0,327	0,424	0,801	1,035	1,132	0,801	0,697	0,749
Criseno	0,178	0,777	0,705	0,494	0,627	1,252	1,498	1,769	1,093	1,106	1,100
Benzo[b+k]fluoranteno	0,296	1,059	1,028	0,722	0,898	1,769	2,349	2,418	1,817	1,695	1,756
Benzo[a]pireno	0,112	0,356	0,473	0,258	0,322	0,601	1,034	0,822	0,661	0,621	0,641

**\*Experimento**

Los resultados del diseño fraccionado de Screening fueron tratados estadísticamente por medio de un test “t” de límite de confianza para analizar el efecto de las variables en la extractabilidad de PAHs en el biosólido utilizado (Tabla 6).

**Tabla 6. Diseño fraccionario ( $2^{4-1}$ ), de screening: Influencia de las variables en la extractabilidad de PAHs en el material de referencia, por el método PSE.**

PAHs	Temperatura	Tiempo Estático	Tiempo Dinámico	Flujo de Solvente
Naftaleno	+	NS	+	NS
Acenaftileno	+	NS	+	NS
Acenafteno	+	NS	+	+
Fluoreno	+	+	+	+
Fenantreno	+	+	+	+
Antraceno	+	+	+	NS
Fluoranteno	+	+	+	NS
Pireno	+	+	+	NS
Benzo[a]antraceno	NS	NS	+	NS
Criseno	NS	NS	+	NS
Benzo[b+k]fluoranteno	+	NS	+	-
Benzo[a]pireno	NS	NS	NS	NS

**(+) Influencia positiva; (-) Influencia negativa; NS = Influencia no significativa para  $P < 0.05$**

Como no se obtiene una clara tendencia sobre la influencia de las variables de estudio en la extracción que se muestra en la Tabla 6, se aplicó sobre los resultados de todos los analitos un análisis de componentes principales. El análisis de componentes principales es un método utilizado con el fin de reducir la cantidad de datos. La idea de aplicar este método es encontrar componentes principales  $Z_1, Z_2, \dots, Z_n$  que sean combinaciones lineales de las variables originales  $X_1, X_2, \dots, X_n$  que describen cada muestra, es decir:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2n}X_n \quad \text{etc.}$$

Los coeficientes  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ , etc., se eligen de manera que las nuevas variables, a diferencia de las variables originales, no se encuentren correlacionadas unas con otras y además que la primera componente principal (CP1),  $Z_1$ , recoja la mayor parte de la variación que hay en un conjunto de datos, la segunda (CP2),  $Z_2$ , recoja la siguiente mayor parte y así sucesivamente. Por lo tanto, cuando haya una correlación significativa el número de componentes principales útiles será mucho menor que el número de variables originales.

Es necesario estandarizar cada variable a media cero y varianza unidad. Si las variables no se estandarizan, y una variable tiene una varianza mucho más grande, entonces esta variable controlará la primera componente principal. La estandarización evita esto haciendo que todas las variables tengan el mismo peso.

A cada componente principal le corresponde un autovalor que proporciona la cantidad de varianza en el conjunto de datos que se encuentra explicada por esa componente principal. El resultado del tratamiento de datos por componentes principales, se muestra en la tabla 7:

**Tabla 7. Análisis de Componentes Principales del procedimiento de screening.**

Componente Numero	Autovalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje acumulado
1	9,79814	81,65	81,65
2	1,16228	9,69	91,34
3	0,749994	6,25	97,59
4	0,1888	1,57	99,16
5	0,0778385	0,66	99,83
6	0,0167192	0,14	99,97
7	0,00409233	0,02	99,99
8	0,000999615	0,00	100
9	0,000237345	0,00	100
10	5,54841E-16	0,00	100
11	5,10568E-17	0,00	100
12	0,0	0,00	100

Al analizar estos datos, se aprecia que el primer componente principal agrupa el 81,65% de la varianza, por lo que con este primer componente se puede derivar la influencia de las variables de estudio en la extracción de PAHs de la muestra de biosólido, y nos da el resultado que se muestra en la Tabla 8.

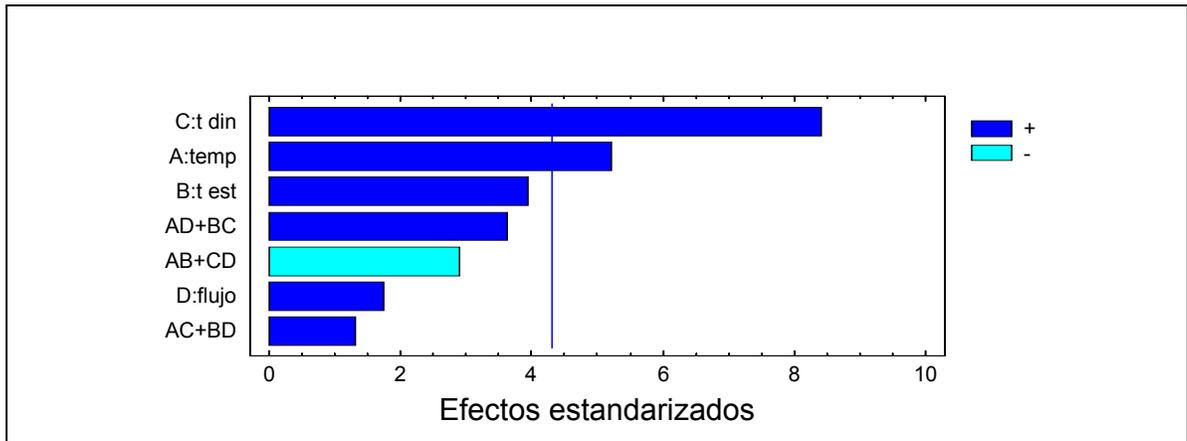
**Tabla 8. Análisis de componentes principales de cada experimento.**

Temperatura (°C)	Tiempo estático (min)	Tiempo dinámico (min)	Flujo (mL/min)	Valores de puntuación del primer componente
50	0	5	1	-4,9967
150	0	5	3	-0,2359
50	20	5	3	-2,2423
150	20	5	1	-2,6359
50	0	30	3	-2,0636
150	0	30	1	2,1992
50	20	30	1	2,7842
150	20	30	3	5,7734
100	10	17,5	2	0,7266
100	10	17,5	2	0,6909
100	10	17,5	2	0,7088

Se consideró el valor de la puntuación del primer componente como la respuesta deseada de cada experimento, y este valor dio cuenta de la influencia de los factores, debido a que los valores de los coeficientes del primer componente son todos positivos, por lo que el valor de puntuación del primer componente es el máximo valor posible para cada experimento, y la ecuación del primer componente principal se muestra a continuación:

$$Z_1 = 0,238923 * X_1 + 0,296088 * X_2 + 0,286003 * X_3 + 0,308746 * X_4 + 0,315575 * X_5 + 0,0948515 * X_6 + 0,318736 * X_7 + 0,318919 * X_8 + 0,310442 * X_9 + 0,315269 * X_{10} + 0,305541 * X_{11} + 0,277697 * X_{12}$$

Con el tratamiento de estos datos, se aprecia en la figura 7 que las variables estadísticamente significativas estudiadas en la extracción de PAHs son:

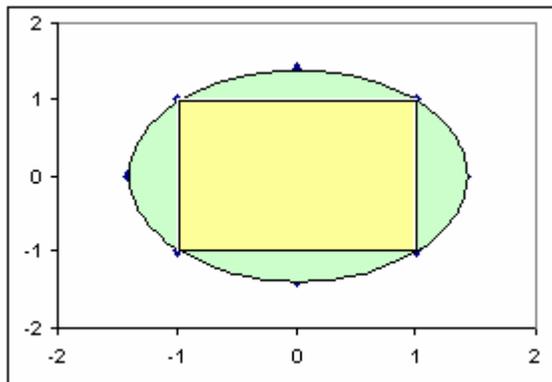


**Figura 7. Gráfico de Pareto de variables de extracción de PAHs desde material de referencia LGC6182.**

De la figura 7, se desprende que existen dos variables estadísticamente significativas que son la temperatura y el tiempo dinámico de extracción, variables que influyen directamente en la extracción, en seguida se procede a la optimización de esta metodología.

### **Optimización del método PSE**

Como herramienta estadística en la optimización de la extracción a través de PSE se utilizó un diseño de compuesto central ( $2^N$  + axiales), que incluye los denominados  $\alpha$ , elementos que aumentan el rango de trabajo que se contempló en el procedimiento de screening, ampliando la información de la influencia que recibe la extracción fuera del rango considerado, ya que aumenta la superficie de trabajo. En la figura 8 se observa una superficie cuadrada de color amarillo y una circular de color verde, que indicaría la ampliación de la zona de trabajo, obteniendo información que podrá resultar útil al momento de optimizar la metodología de extracción.



**Figura 8. Superficie de trabajo.**

En la Tabla 9 se muestra el intervalo de trabajo del diseño experimental utilizado.

**Tabla 9. Diseño de Compuesto Central ( $2^N$  + axiales).**

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo Dinámico (minutos)
1	50	5
2	150	5
3	50	30
4	150	30
5	30	17,5
6	210	17,5
7	100	3
8	100	42
9	100	17,5
10	100	17,5
11	100	17,5

Los once experimentos fueron realizados con 300 mg de muestra, a un flujo de 2 mL/min y sin tiempo estático. Se estudiaron los parámetros que influyen en la extracción entre los siguientes intervalos:

Temperatura: 30 - 210°C

Tiempo dinámico: 3 - 42 minutos

Los resultados de la influencia de cada variable se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Resultados del Diseño de Compuesto Central (2<sup>N</sup> + axiales). Valores en razón de áreas entre cada compuesto y el estándar interno.**

PAHs	*1	*2	*3	*4	*5	*6	*7	*8	*9	*10	*11
Naftaleno	0,174	0,212	0,215	0,144	0,146	0,511	0,075	1,056	0,547	0,325	0,436
Acenaftileno	0,024	0,039	0,037	0,046	0,020	0,048	0,006	0,082	0,054	0,047	0,051
Acenafteno	0,028	0,052	0,042	0,029	0,023	0,035	0,018	0,254	0,086	0,051	0,068
Fluoreno	0,093	0,056	0,075	0,129	0,084	0,139	0,036	0,501	0,291	0,196	0,243
Fenantreno	0,486	0,986	1,19	1,637	0,557	0,085	0,146	2,039	1,614	1,308	1,461
Fluoranteno	0,833	1,389	1,996	2,980	1,174	2,988	0,239	3,342	3,764	2,844	3,304
Pireno	1,013	1,713	0,816	1,028	0,511	1,081	0,616	8,623	1,728	1,148	1,438
Criseno	0,878	0,962	0,804	1,330	0,678	1,203	0,451	6,305	1,886	1,359	1,623
Benzo[b+k]fluoranteno	1,283	1,331	1,206	1,716	1,183	1,527	0,395	5,526	2,291	1,804	2,047
Benzo[a]Pireno	0,436	0,488	0,414	0,606	0,458	0,569	0,136	1,908	0,871	0,637	0,754
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,601	0,809	0,541	1,160	0,896	1,080	0,162	2,269	1,241	1,106	1,173
Dibenzo[a,h]antraceno	0,374	0,514	0,315	0,832	0,693	0,757	0,113	1,582	0,834	0,773	0,804
Benzo[g,h,i]perileno	0,848	1,214	0,744	1,492	1,279	1,375	0,225	3,151	1,688	1,478	1,583

\* Experimentos

Como cada analito presentaba alguna diferencia en la respuesta óptima de extracción, se realizó un Análisis de Respuesta Múltiple, en donde se agrupan todas las superficies de respuesta de cada analito y se tratan todas las respuestas como un conjunto (figura 9).

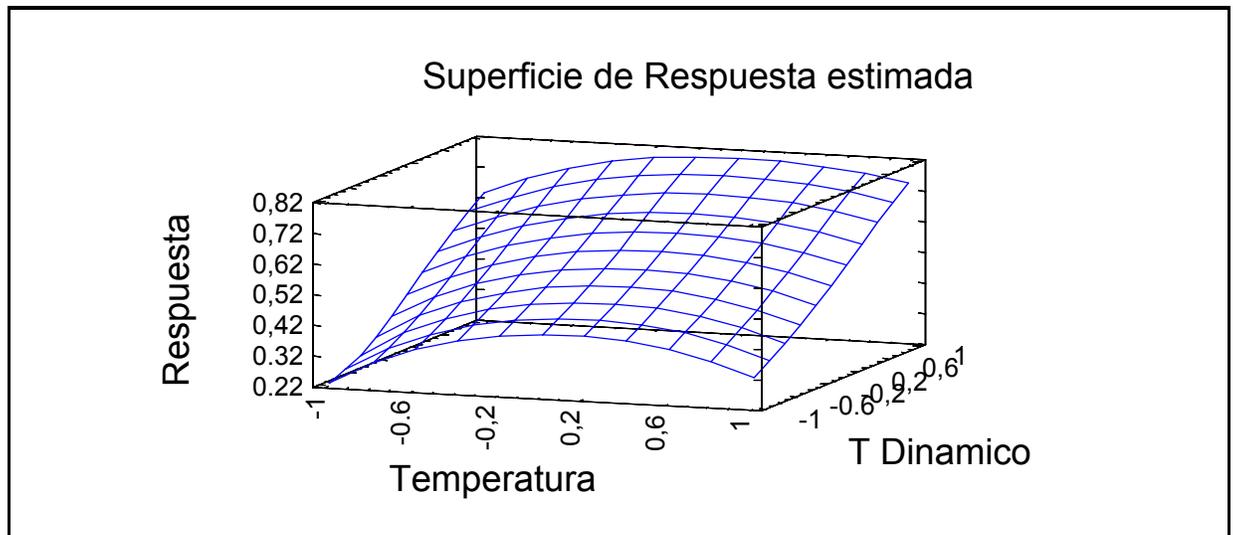


Figura 9. Superficie de respuesta estimada de PAHs por el método PSE.

Tabla 11. Valor óptimo estimado de la superficie de respuesta.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	-1,41421	1,41421	0,237475
T Dinámico	-1,41421	1,41421	1,41421

La respuesta entregada en la Tabla 11 está codificada, tomando un valor de -1,41421 para el menor valor del intervalo y 1,41421 para el valor mayor del intervalo, haciendo la conversión correspondiente, el valor óptimo de extracción de este método es a una temperatura de 110°C y un tiempo dinámico de 42 minutos.

Para validar las condiciones óptimas de extracción, se realizaron 5 extracciones en las condiciones óptimas predichas por el modelo estadístico y se compararon con los valores del material de referencia, para así evaluar el porcentaje de extractabilidad en estas condiciones, estos resultados se indican en la Tabla 12.

**Tabla 12. Extracciones realizadas en condiciones óptimas de temperatura (110°C) y tiempo Dinámico (42 minutos), comparadas con el material de referencia.**

PAHs	Valor obtenido mg/kg	Valor referencia mg/kg	% Recuperado
Naftaleno	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,15	72,73
Acenafteno	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,04	50,00
Fluoreno	0,10 ± 0,01	0,19 ± 0,06	52,63
Fenantreno	0,78 ± 0,09	1,04 ± 0,27	75,00
Antraceno	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,06	47,06
Fluoranteno	1,60 ± 0,12	1,81 ± 0,45	88,40
Pireno	1,34 ± 0,18	1,53 ± 0,47	87,58
Benzo[a]antraceno	0,66 ± 0,10	0,66 ± 0,24	100,00
Criseno	1,06 ± 0,15	0,84 ± 0,18	126,19
Benzo[b+k]fluoranteno	1,43 ± 0,20	1,40 ± 0,37	102,14
Benzo[a]pireno	0,58 ± 0,13	0,59 ± 0,10	98,31
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,52 ± 0,10	0,58 ± 0,14	89,66
Benzo[g,h,i]perileno	0,74 ± 0,13	0,62 ± 0,31	119,35

Los porcentajes de recuperación para los compuestos más livianos (Tabla 12) presentan bajas recuperaciones, siendo atribuible a la volatilidad que presentan, la cual disminuye con el aumento del peso molecular. Para acenaftileno, fluoreno y antraceno son los valores más bajos, de esta forma, sólo se puede aplicar el método en forma cualitativa para el análisis de estos compuestos.

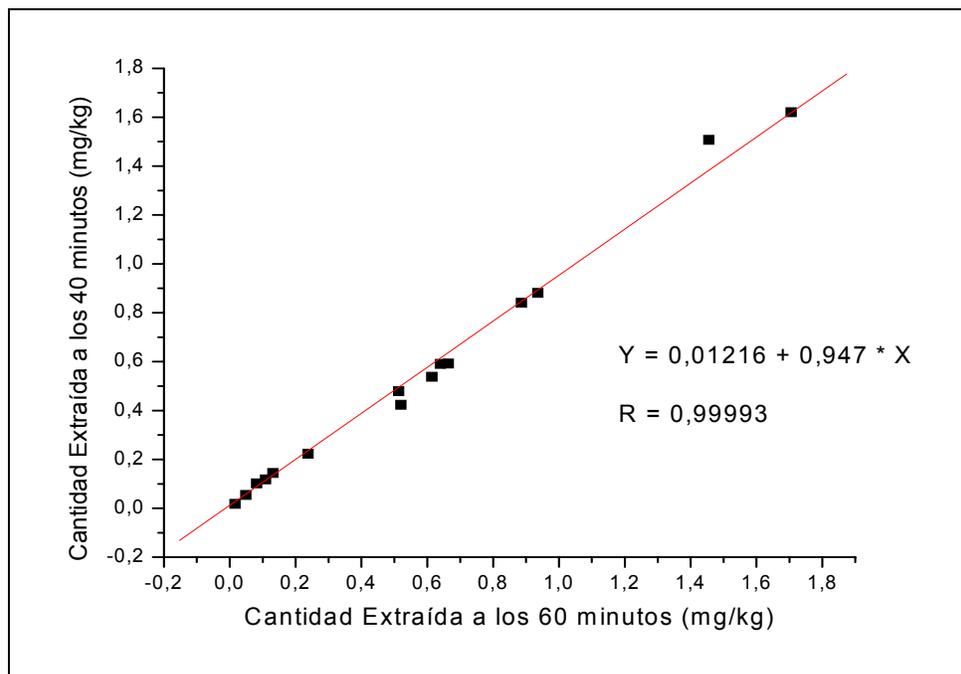
Para evaluar la eficiencia de la extracción al prolongar el tiempo de extracción del solvente presurizado, se compararon distintos tiempos de extracción de compuestos aromáticos en el biosólido, y se escogieron los tiempo de extracción 20, 40 y 60 minutos, los resultados se presentan en la Tabla 13.

**Tabla 13. Comparación de la cantidad extraída de PAHs del material de referencia a distintos tiempos de extracción a 110°C, flujo de extracción de 2mL/min y 300 mg de muestra. Valores en mg/kg.**

PAHs	20 minutos	40 minutos	60 minutos
Naftaleno	0,223	0,223	0,238
Acenaftileno	0,022	0,018	0,016
Acenafteno	0,046	0,055	0,049
Fluoreno	0,092	0,118	0,109
Fenantreno	0,662	0,841	0,886
Antraceno	0,066	0,102	0,082
Fluoranteno	1,265	1,620	1,705
Pireno	1,079	1,507	1,455
Benzo[a]antraceno	0,366	0,591	0,640
Criseno	0,566	0,881	0,936
Benzo[b+k]fluoranteno	0,307	0,592	0,664
Benzo[a]pireno	0,218	0,424	0,520
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,173	0,479	0,513
Dibenzo[a,h]antraceno	0,039	0,144	0,131
Benzo[g,h,i]perileno	0,207	0,538	0,614

De los datos en la Tabla 13, se aprecia claramente que pasados los 40 minutos de extracción, la cantidad de analito extraído no varía demasiado entre 40 y 60 minutos de extracción, por lo que no es necesario prolongar el tiempo dinámico y el valor predicho por el programa estadístico se cumple con los datos experimentales, además al graficar la cantidad extraída para cada compuesto a los tiempos de extracción de 40

y 60 minutos (Figura 10), y realizando una regresión lineal con estos datos, el intercepto da un valor cercano a cero y la pendiente presenta un valor cercano 1, lo que implica que los datos son muy parecidos, no existiendo una diferencia significativa en las recuperaciones de PAHs a 40 y 60 minutos de extracción, y por lo tanto no se justifica prolongar este tiempo.



**Figura 10. Comparación tiempo de extracción de 40 versus 60 minutos.**

### **Comparación de los métodos de extracción Soxhlet y PSE.**

La tabla 14 muestra el porcentaje de recuperación de PAHs desde biosólidos, obtenido por medio de una extracción Soxhlet y por PSE.

**Tabla 14. Porcentajes de extracción de PAHS desde biosólido utilizando extracción Soxhlet y PSE.**

PAHs	% Recuperación PSE	% Recuperación Soxhlet
Naftaleno	72,7	50,3
Acenafteno	50,0	54,5
Fluoreno	52,6	74,9
Fenantreno	75,0	67,6
Antraceno	47,1	73,9
Fluoranteno	88,4	25,5
Pireno	87,6	10,2
Benzo[a]antraceno	100,0	48,6
Criseno	126,2	41,5
Benzo[b+k]fluoranteno	102,1	53,7
Benzo[a]pireno	98,3	52,1
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	89,7	56,9
Benzo[g,h,i]perileno	119,4	76,3

La Tabla 14 muestra que el método de extracción PSE es más eficiente en cuanto al porcentaje de recuperación de los PAHs, además en éste se utiliza menor cantidad de solvente y un menor tiempo de extracción, por lo que se convierte en una interesante metodología para implementar.

#### **Determinación de PAHs en muestras de biosólido El Trebal.**

El método de extracción fue aplicado en las muestras de biosólidos provenientes de la planta de tratamiento de aguas servidas El Trebal, muestreadas en distintos años, cuyos resultados se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Concentración de PAHs en biosólidos proveniente de la planta El Trebal muestreados en distintas épocas. Valores en mg/kg.**

PAHs	Septiembre 2004	Abril 2005	Junio 2005	Enero 2006
Naftaleno	0,095 ± 0,052	0,105 ± 0,015	0,188 ± 0,016	0,086 ± 0,030
Acenaftileno	ND	ND	ND	ND
Acenafteno	0,015 ± 0,006	0,039 ± 0,007	0,038 ± 0,014	0,012 ± 0,003
Fluoreno	0,078 ± 0,001	0,188 ± 0,013	0,245 ± 0,001	0,081 ± 0,017
Fenantreno	0,401 ± 0,040	0,570 ± 0,123	0,558 ± 0,066	ND
Antraceno	ND	0,086 ± 0,121	ND	ND
Fluoranteno	0,262 ± 0,001	0,223 ± 0,099	0,190 ± 0,052	0,087 ± 0,011
Pireno	1,092 ± 0,085	0,940 ± 0,245	0,757 ± 0,220	0,346 ± 0,062
Benzo[a]antraceno	0,051 ± 0,015	0,111 ± 0,006	0,073 ± 0,029	ND
Criseno	0,138 ± 0,053	0,098 ± 0,016	0,114 ± 0,028	0,041 ± 0,009
Benzofluoranteno	ND	ND	ND	ND
Benzo[a]pireno	ND	ND	ND	ND
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	ND	ND	ND	ND
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	ND	ND
Benzo[g,h,i]perileno	ND	ND	ND	ND
PAHs totales	2,132 ± 0,121	2,360 ± 0,316	2,163 ± 0,240	0,653 ± 0,072

De los valores obtenidos en la tabla 15, se desprende que el biosólido muestreado en enero de 2006 presenta los menores valores de concentración de PAHs. Por el contrario, los biosólidos muestreados en años anteriores contienen concentraciones mayores y comparables de estos contaminantes. Por otra parte, en los cuatro biosólidos analizados no se detectó la presencia de los compuestos más pesados, además de acenaftileno y antraceno.

**Labilidad/biodegradación de PAHs en sistema suelo-biosólido incubados por 30 días.**

Se realizó este estudio con las mezclas de suelo-biosólido en relación 30 toneladas de biosólido por hectárea de suelo. Para evaluar la labilidad de PAHs, primeramente, se confirmó su ausencia en los cuatro suelos. De esta forma, la concentración de PAHs en la mezcla suelo-biosólido sólo depende del contenido presente en el biosólido de enmienda.

El biosólido que se utilizó en la enmienda corresponde al muestreado en abril de 2005, el cual, además, fue enriquecido con una concentración de 42,5 mg/kg de PAHs para apreciar de forma más clara el efecto de labilidad/biodegradación de estos contaminantes. Este enriquecimiento fue necesario dado que las concentraciones basales de PAHs son muy bajas para ver claramente el efecto que experimentan estos contaminantes al mezclarlos con la matriz suelo, en la proporción seleccionada de 30 Mg/ha.

Los resultados de la incubación se presentan en la tabla 16.

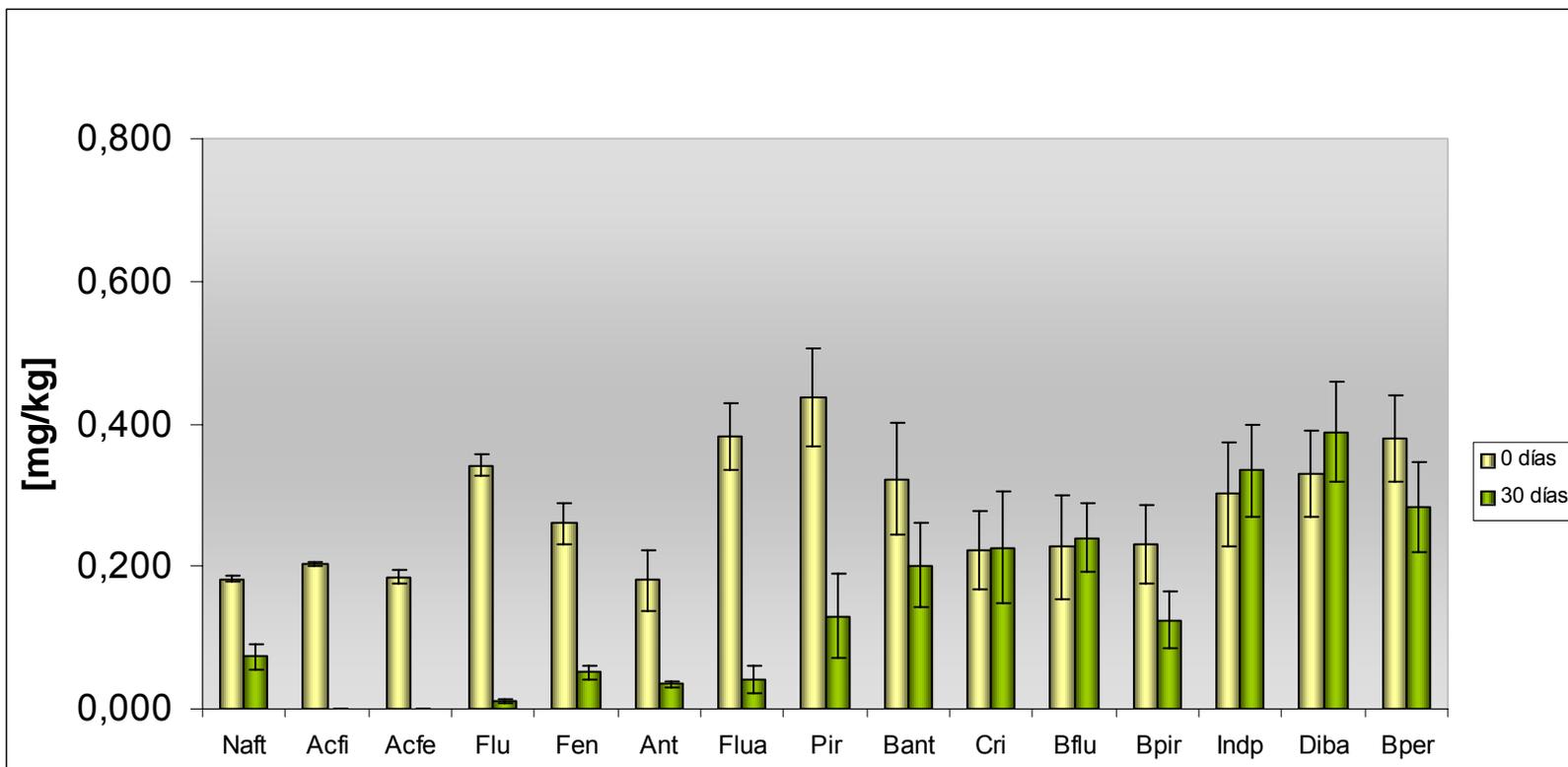
**Tabla 16. Concentraciones de PAHs en la mezcla suelo-biosólido Coyuncaví Bajo, El Maitén, La Paloma y Miraflores a 0 y 30 días de incubación. Valores en mg/kg.**

PAHs	Coyuncaví Bajo 0 día	Coyuncaví Bajo 30 días	El Maitén 0 día	El Maitén 30 días	La Paloma 0 día	La Paloma 30 días	Miraflores 0 día	Miraflores 30 días
Naftaleno	0,182 ± 0,003	0,073 ± 0,019	0,175 ± 0,034	0,172 ± 0,031	0,094 ± 0,025	0,079 ± 0,002	0,130 ± 0,015	0,130 ± 0,040
Acenaftileno	0,203 ± 0,003	ND	0,168 ± 0,009	ND	0,077 ± 0,007	ND	0,117 ± 0,002	ND
Acenafteno	0,185 ± 0,010	ND	0,367 ± 0,021	ND	0,072 ± 0,013	ND	0,205 ± 0,003	ND
Fluoreno	0,342 ± 0,016	0,011 ± 0,002	0,290 ± 0,038	0,016 ± 0,000	0,168 ± 0,002	ND	0,198 ± 0,013	ND
Fenantreno	0,260 ± 0,030	0,051 ± 0,010	0,450 ± 0,023	0,064 ± 0,005	0,179 ± 0,016	0,026 ± 0,004	0,350 ± 0,030	0,027 ± 0,007
Antraceno	0,180 ± 0,043	0,035 ± 0,005	0,488 ± 0,034	0,049 ± 0,010	0,080 ± 0,000	ND	0,204 ± 0,034	ND
Fluoranteno	0,383 ± 0,047	0,041 ± 0,020	0,232 ± 0,015	0,068 ± 0,021	0,304 ± 0,027	0,018 ± 0,000	0,458 ± 0,033	0,041 ± 0,019
Pireno	0,437 ± 0,068	0,130 ± 0,059	0,561 ± 0,057	0,177 ± 0,005	0,414 ± 0,047	0,028 ± 0,012	0,323 ± 0,030	0,052 ± 0,017
Benzo[a]antraceno	0,322 ± 0,078	0,201 ± 0,059	0,447 ± 0,075	0,280 ± 0,032	0,269 ± 0,062	0,144 ± 0,062	0,442 ± 0,065	0,335 ± 0,053
Criseno	0,222 ± 0,056	0,226 ± 0,078	0,372 ± 0,024	0,304 ± 0,016	0,324 ± 0,032	0,233 ± 0,023	0,564 ± 0,106	0,279 ± 0,068
Benzo[b+k]fluoranteno	0,227 ± 0,073	0,240 ± 0,049	0,397 ± 0,098	0,387 ± 0,012	0,319 ± 0,052	0,264 ± 0,061	0,318 ± 0,100	0,281 ± 0,015
Benzo[a]pireno	0,231 ± 0,055	0,124 ± 0,040	0,457 ± 0,097	0,363 ± 0,021	0,167 ± 0,010	0,136 ± 0,036	0,208 ± 0,049	0,088 ± 0,000
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,302 ± 0,072	0,335 ± 0,065	0,432 ± 0,084	0,488 ± 0,053	0,315 ± 0,015	0,250 ± 0,071	0,347 ± 0,094	0,301 ± 0,007
Dibenzo[a,h]antraceno	0,329 ± 0,061	0,389 ± 0,070	0,408 ± 0,107	0,498 ± 0,011	0,321 ± 0,070	0,376 ± 0,112	0,365 ± 0,064	0,294 ± 0,006
Benzo[g,h,i]perileno	0,380 ± 0,060	0,283 ± 0,063	0,395 ± 0,092	0,447 ± 0,052	0,313 ± 0,017	0,306 ± 0,090	0,302 ± 0,074	0,193 ± 0,005

Las Figuras 11-14 muestran el efecto del tiempo de incubación en los suelos enmendados con biosólidos. Se aprecia que independientemente del tiempo de incubación, la recuperación de PAHs no es cuantitativa y es significativamente menor en los compuestos más livianos, ya que en esta instancia se esperaban recuperaciones de alrededor de los 0,5 mg/kg de cada analito para cada mezcla suelo/biosólido. Se ha encontrado que en mezclas de suelo-biosólido existe una baja volatilización y degradación fotoquímica de PAHs (Beck et al, 1996; Cousins et al 1997) por lo tanto, esta baja recuperación de PAHs puede atribuirse a la interacción de estos compuestos con la materia orgánica del biosólido y los suelos utilizados. En este plano, se puede establecer que la extractabilidad de PAHs en el suelo enmendado dependería entonces de la fuerza de interacción con los sitios activos de la materia orgánica, especialmente con las estructuras húmicas (humina, ácidos fúlvico y húmico) de ésta (Kohl y Rice, 1998; Luthy, 1997). La materia orgánica juega un rol importante, es un fuerte adsorbente de PAHs, y es en este lugar en donde se esperaría encontrar a estos compuestos. Los PAHs al ingresar a la materia orgánica interaccionan con los ácidos húmico (peso molecular entre 10.000-100.000 dalton) y fúlvico (peso molecular entre 2.000-10.000 dalton) (Xing, 1997), y la humina (peso molecular mayor a 100.000 dalton) siendo esta última la fracción más polimérica y la más estable. Además, se ha descrito que los microorganismos pueden disponer de los PAHs directamente de los ácidos húmico y fúlvico (Laor, 1996). En consecuencia, la explicación de la menor recuperación sería atribuible a la fuerte interacción entre compuestos hidrofóbicos y la humina, y para que este fenómeno ocurra necesita de dos procesos, el primero es la adsorción en los ácidos húmico y fúlvico para una posterior difusión hacia la humina, lugar en donde quedan fuertemente retenidos. Debido a las distintas cinéticas de difusión a través de los ácidos húmico y fúlvico, tendrán una mayor afinidad por el ácido húmico los PAHs más pesados, y aquellos compuestos con menor peso molecular serán adsorbidos por la humina en un menor tiempo en relación a los más pesados (Bogan, 2003). En los cuatro suelos se aprecia esta tendencia, los compuestos de dos y tres anillos presentan las menores concentraciones a tiempo cero de incubación, en comparación a los compuestos de cinco a seis anillos, que se acercan más al valor esperado. Otros autores han informado este fenómeno de "perdida" o menor extracción de PAHs en suelos (Amir, 2005), fenómeno que lo

atribuyen a las interacciones con la humina, pero además a las interacciones con el material lipídico presente en estos sustratos (Nieman, 1999; Kohl y Rice, 1998). El suelo La Paloma tiene una textura arenosa, presenta un alto grado de erosión, y tiene una baja cantidad de materia orgánica, posiblemente en su materia orgánica existe predominancia de la fracción humina, por lo tanto su comportamiento fue distinto a los otros suelos. Los otros suelos tienen una mayor proporción de arcilla (Anexos, Tabla D), por tanto su reactividad sería mayor que la del suelo La Paloma. Por otra parte, tienen un mayor contenido de materia orgánica, que posiblemente no está en su último grado de humificación, es decir habría una mayor presencia de ácidos fúlvico y húmico, lo cual podría justificar según lo reportado por Bogan (2003), la mayor concentración obtenida.

Por otra parte, después de la incubación, se encontró que en los cuatro suelos hubo una menor concentración de compuestos de dos a cuatro anillos bencénicos, mientras que la concentración de los compuestos de cinco y seis anillos no tuvo mayor variación antes y después de la incubación. La menor concentración de los compuestos de dos a cuatro anillos después de la incubación, podría ser atribuible a la biodegradación que experimentarían estos compuestos por parte de los microorganismos presentes en el suelo y el biosólido. Se ha reportado que la biodegradación de los compuestos de cinco a seis anillos, podría ser posible a través del mecanismo de co-metabolismo (Rogers, 2002), que se produciría por ejemplo, en la mineralización de dibenzo[a,h]antraceno y benzo[a]pireno, que aumentaría con la presencia de fenantreno (Juhasz, 2000). La razón de la limitada biodegradación de algunos PAHs es debido a que se degradarían primero los compuestos de menor peso molecular y además por la presencia de surfactantes en el biosólido, que podrían facilitar el proceso de desorción de PAHs de 5-6 anillos (Cesare y Smith, 1994). En los cuatro suelos después de la incubación, se observó una escasa presencia de fenantreno, lo cual podría ser la causa de la pequeña disminución de la concentración de benzo[a]pireno observada, ya que como se mencionó anteriormente, la biodegradación de benzo[a]pireno estaba favorecida por la presencia de fenantreno (Juhasz, 2000).

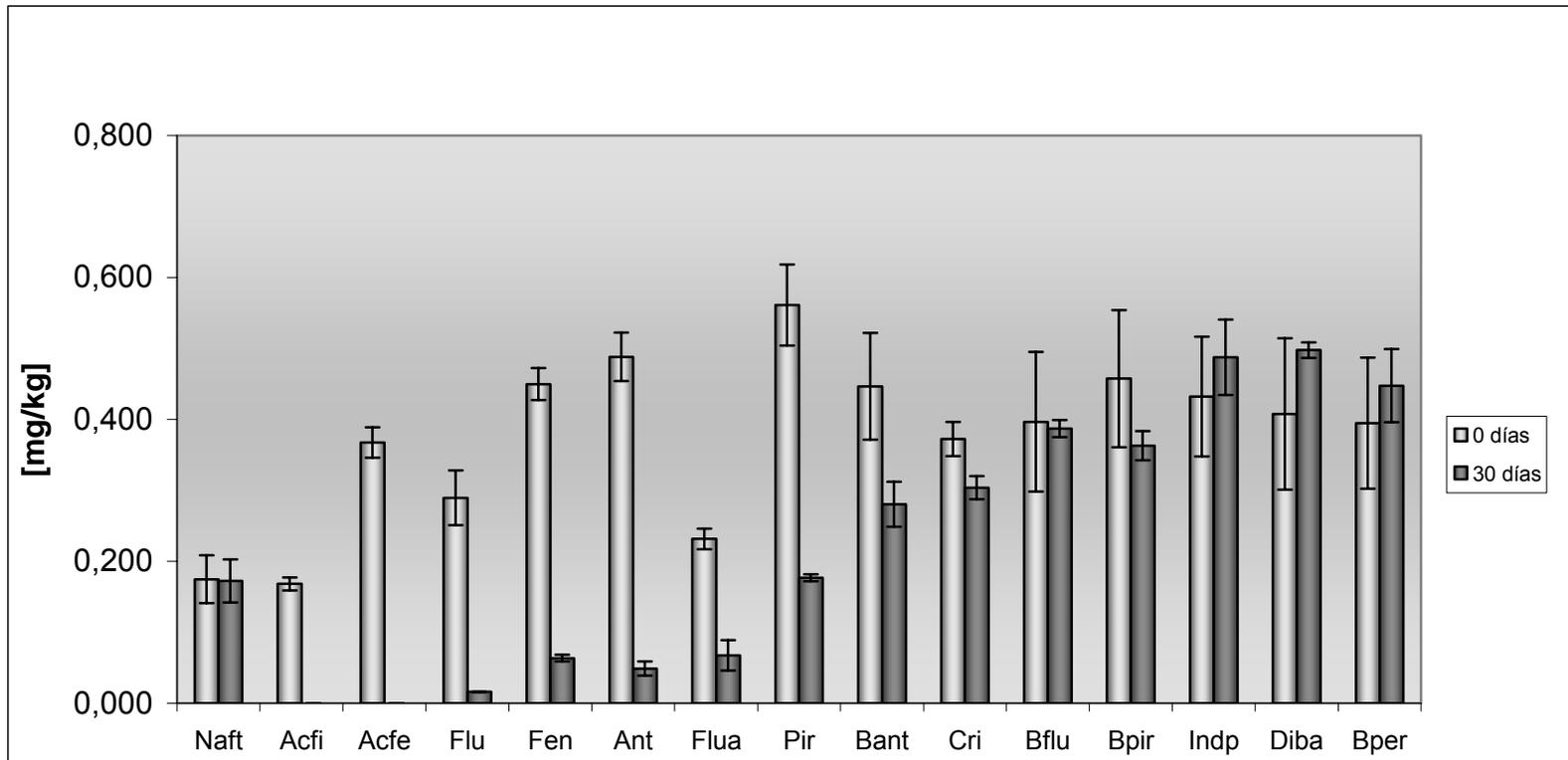


**Figura 11. Incubación de la mezcla suelo Coyuncaví Bajo-biosólido en relación de 30 ton/ha a 0 y 30 días de incubación.**

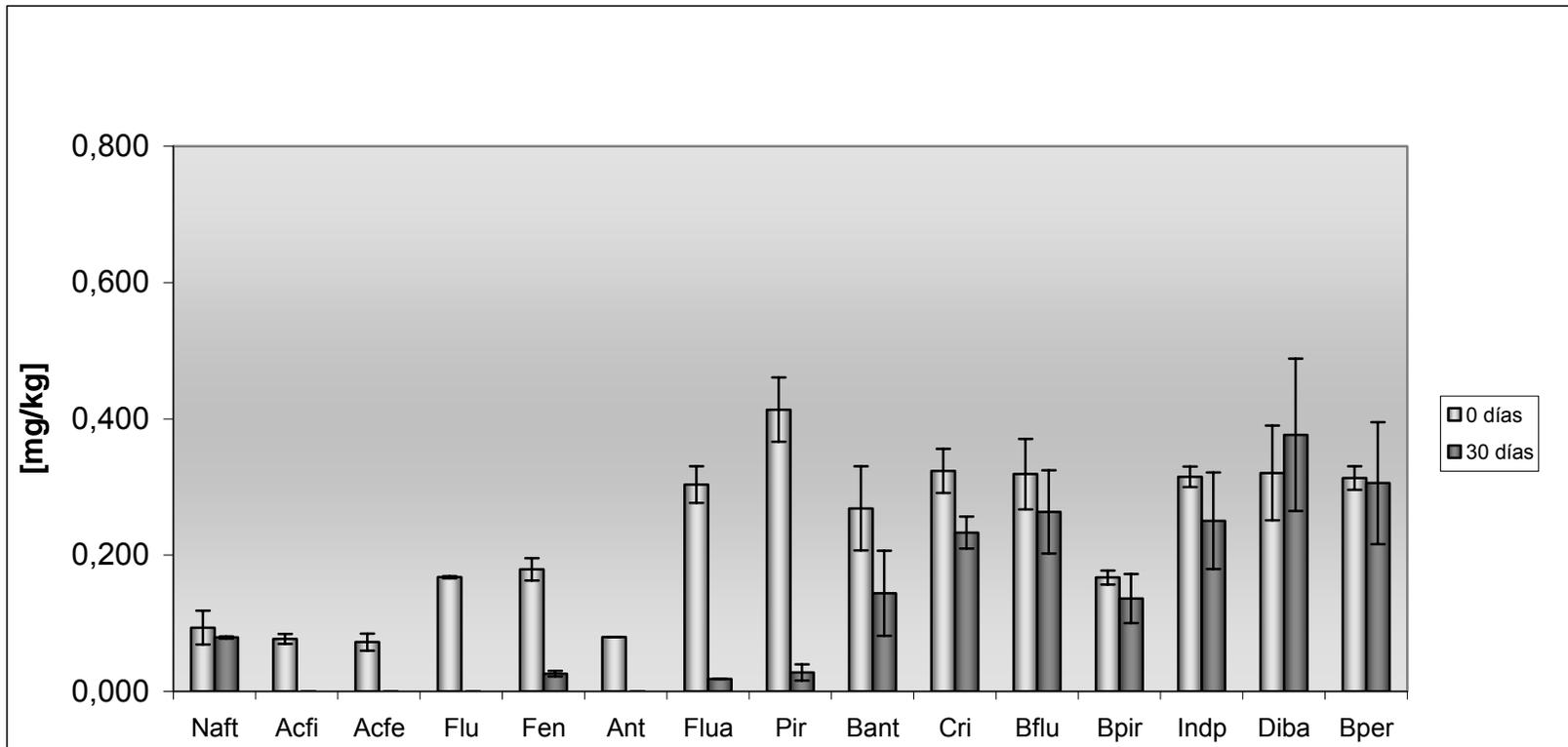
(Naft = naftaleno; Acfi = acenaftileno; Acfe = acenafteno; Flu = fluoreno; Fen = fenantreno; Ant = antraceno;

Flua = fluoranteno; Pir = pireno; Bant = benzo[a]antraceno; Cri = criseno; Bflu = benzo[b+k]fluoranteno;

Bpir = benzo[a]pireno; Indp= indeno[1,2,3-c,d]pireno; Diba = dibenzo[a,h]antraceno; Bper = benzo[g,h,i]perileno)

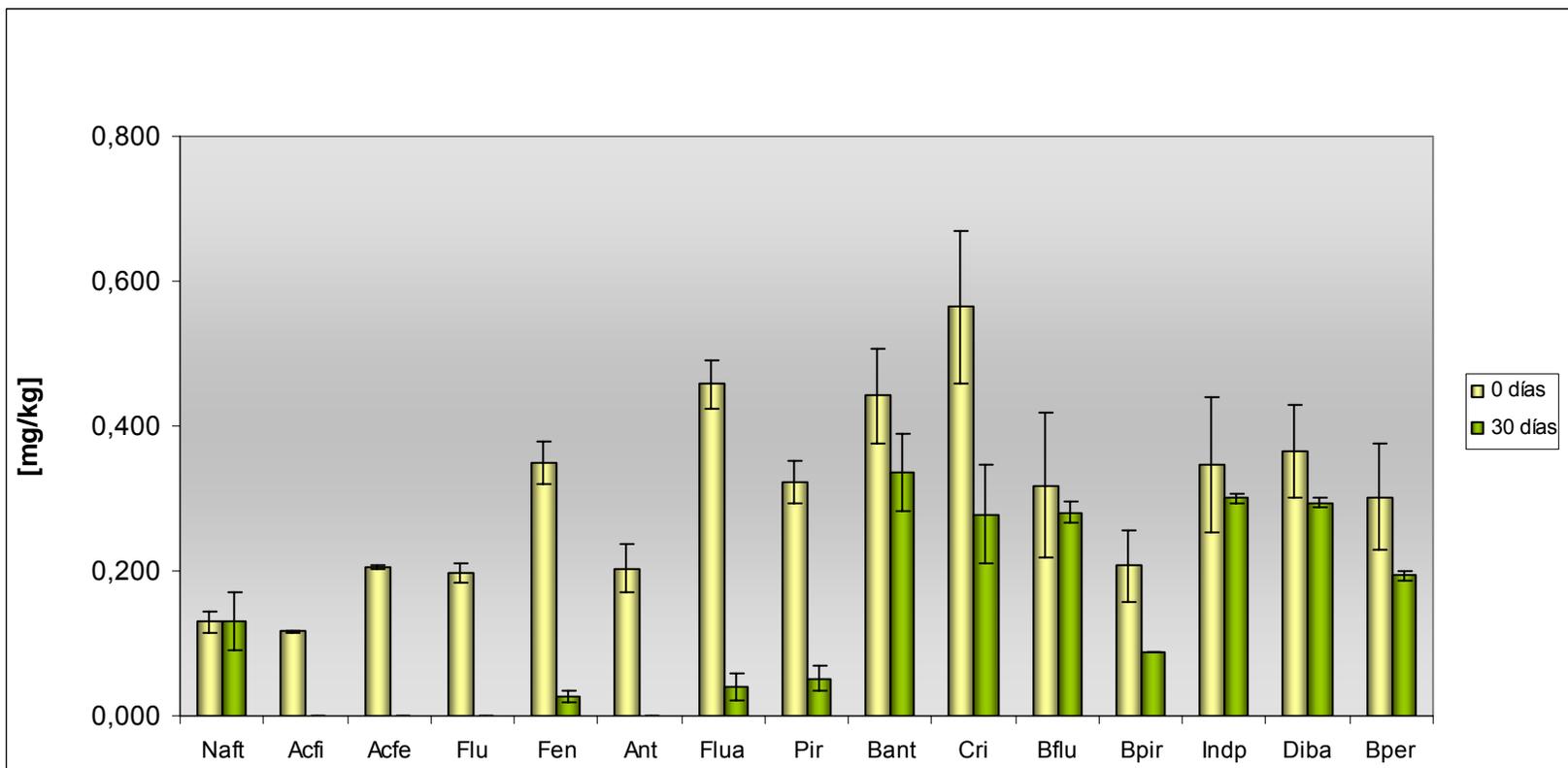


**Figura 12. Incubación de la mezcla suelo El Maitén-biosólido en relación de 30 ton/ha a 0 y 30 días de incubación.**  
 (Naft = naftaleno; Acfi = acenaftileno; Acfe = acenafteno; Flu = fluoreno; Fen = fenantreno; Ant = antraceno;  
 Flua = fluoranteno; Pir = pireno; Bant = benzo[a]antraceno; Cri = criseno; Bflu = benzo[b+k]fluoranteno;  
 Bpir = benzo[a]pireno; Indp= indeno[1,2,3-c,d]pireno; Diba = dibenzo[a,h]antraceno; Bper = benzo[g,h,i]perileno)



**Figura 13. Incubación de la mezcla suelo La Paloma-biosólido en relación de 30 ton/ha a 0 y 30 días de incubación.**

(Naft = naftaleno; Acfi = acenaftileno; Acfe = acenafteno; Flu = fluoreno; Fen = fenantreno; Ant = antraceno; Flua = fluoranteno; Pir = pireno; Bant = benzo[a]antraceno; Cri = criseno; Bflu = benzo[b+k]fluoranteno; Bpir = benzo[a]pireno; Indp= indeno[1,2,3-c,d]pireno; Diba = dibenzo[a,h]antraceno; Bper = benzo[g,h,i]perileno)



**Figura 14. Incubación de la mezcla suelo Miraflores-biosólido en relación de 30 ton/ha a 0 y 30 días de incubación.**

(Naft = naftaleno; Acfi = acenaftileno; Acfe = acenafteno; Flu = fluoreno; Fen = fenantreno; Ant = antraceno; Flua = fluoranteno; Pir = pireno; Bant = benzo[a]antraceno; Cri = criseno; Bflu = benzo[b+k]fluoranteno; Bpir = benzo[a]pireno; Indp= indeno[1,2,3-c,d]pireno; Diba = dibenzo[a,h]antraceno; Bper = benzo[g,h,i]perileno)

## **CONCLUSIONES**

- En la extracción Soxhlet, la extractabilidad de PAHs con la mezcla acetona-diclorometano desde una matriz de biosólido, fue más eficiente que cuando se utilizó diclorometano solo. La mezcla acetona-diclorometano podría atravesar la barrera de moléculas de agua que se encuentran en la superficie de los sitios activos, y luego lograr extraer los PAHs retenidos en la materia orgánica.
- Las variables que influyen significativamente en la extracción de PAHs son la temperatura y el tiempo dinámico de extracción. La temperatura aumenta la solubilidad de estos compuestos aromáticos.
- Las condiciones óptimas de extracción de PAHs desde una matriz de biosólidos se encontró que debe realizarse a una temperatura de 110°C y un tiempo dinámico de 42 minutos de extracción, de este modo se logró una recuperación en un rango de 72-126%, para la mayoría de los compuestos de PAHs, con la excepción de acenafteno, fluoreno y antraceno que presentaron recuperaciones alrededor de 50%, que se puede atribuir a la volatilidad de estos compuestos, sobre todo los dos primeros.
- La extracción PSE utiliza una cantidad considerablemente menor de solvente respecto de una extracción Soxhlet, aspecto monetario y ambientalmente beneficioso, por los desechos que se generan post-análisis.
- Con PSE se obtiene un menor tiempo de extracción, ya que se reduce drásticamente los tiempos de extracción, de 24 horas (Soxhlet) a alrededor de 40 minutos. Esto ocasiona una frecuencia de tratamiento de muestras altamente favorable para la PSE, lo cual es de alta relevancia en laboratorios de rutina.
- Respecto al análisis de muestras reales, el biosólido muestreado en Enero 2006 presenta una menor contaminación de PAHs en relación a los demás biosólidos analizados. Por el contrario, los biosólidos muestreados en años anteriores contienen concentraciones mayores y

comparables de estos contaminantes. Además, en los cuatro biosólidos analizados no se detectó la presencia de los compuestos más pesados, además de acenaftileno y antraceno.

- Los compuestos de PAHs, al inicio de la incubación presentaron una menor concentración en las mezclas suelo-biosólido, posiblemente se debe al hecho que experimentan una retención en la fracción de humina de la materia orgánica. Existe información que avalan estos resultados, los compuestos más livianos son fuertemente retenidos en la humina, mientras que los más pesados, se ven menos afectados, porque interaccionan por mayor tiempo con los ácidos húmico y fúlvico de la materia orgánica.
- Después del tiempo de incubación de los suelos enmendados con biosólidos no se obtuvo la totalidad de los compuestos de PAHs respecto del tiempo cero. Esta disminución, de la concentración de PAHs en los cuatro suelos, es atribuible a la degradación de estos compuestos por microorganismos del biosólido y del suelo, mayoritariamente de los PAHs de dos a cuatro anillos bencénicos, ya que los compuestos de cinco y seis anillos se degradan por co-metabolismo (presencia de un compuesto aromático de menor peso molecular).

## REFERENCIAS

1. Albers, P. 1995. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers. Boca Raton. 330-355.
2. Amir, S., M. Hafidi, G. Merlina, H. Hamdi, J.C. Revel. 2005. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge. Chemosphere. 58, 449-458.
3. Basel, A. 2002. Natural attenuation: How is mother nature aiding us to cleanse our environmental sins?. Practice Periodical of Hazardous, toxic, and Radioactive waste Management. 6, 139-140.
4. Beck, A. J., D.L. Johnson, K.C. Jones. 1996. The form and bioavailability of non-ionic organic chemical in sewage sludge-amended agricultural soils. Science Total Environmental. 185, 125-149.
5. Berg, M., D. Meent, W. Peijnenburg, D. Sijm. 1995. Transport, accumulation and transformation process. In: C.J. van Leeuwen and J.L.M. Hermens (ed). Risk assessment of chemical; and Introduction. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
6. Bogan, B., V. Trbovic. 2003. Effect of sequestration on PAH degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin and soil porosity. Journal of Hazardous Materials. B100, 285-300.
7. Bollag, J.M., 1992. Decontaminating soil with enzymes. Environmental Science and Technology. 26, 1876-1881.
8. Camel, Valérie. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices – supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave–assisted extraction: their potential and pitfalls. Analyst. 126, 1182 – 1193.
9. Castro, C.P., O., Henriquez, R., Freres. 2007. Posibilidades de aplicación de lodos o biosólidos a los suelos del sector norte de la Región Metropolitana de Santiago. Revista de Geografía Norte Grande. no. 37, 35-45.
10. Cesare, D.D., J.A., Smith. 1994. Surfactant effect on desorption rate of nonionic organic compounds from soils to water. Environmental Contamination and Toxicology. 134, 1-29.

11. CIREN. CORFO. 1984. Centro de información de recursos naturales. Descripción de suelos proyecto Maipo. Santiago, Chile. 102p.
12. CONAMA (Comisión Nacional del Medio Ambiente). 2000. Anteproyecto de reglamento para el manejo de lodos no peligrosos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas. Título III. "De la aplicación benéfica de lodos al suelo.
13. Conte, P., et al. 2000. Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbon in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environmental pollution*. 112, 27-31.
14. Cousins, I.T., N. Hartlieb, C. Teichmann, K.C. Jones. 1997. Measured and predicted volatilisation fluxes of PCBs from contaminated sludges- amended soil. *Environmental Pollution*. 97: 229-238.
15. Epstein E. 2003. *Land Application of Sewage Sludge and Biosolids*. Lewis Publishers. CRC Press. Boca Raton, USA.
16. Hawthorne, S.B., C. Grabanski, E. Martin and D. Miller. 2000. Comparison of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal Of Chromatography A*. 892, 421-433.
17. Juhasz, A.L., R. Naidu. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. A review of the microbial degradation of benz[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45, 57-88.
18. Keith, B., D. Adelman, M. Simon. 2001. Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt 2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 6692-6697.
19. King, L. D., L. A. Rudgers, and L. R. Webber. 1974. Application of Municipal Refuse and Liquid Sewage Sludge to Agricultural Land: I. Field Study. *J. Environmental Quality*. 3, 361 – 366.
20. Kohl, S.D., J.A. Rice. 1998. The binding of contaminant to humin, a mass balance. *Chemosphere*. 36, 251-261
21. Koss, G., I. Tesseraux. 1999. *Toxicology*. Academic Press. San Diego. 603-644.

22. Laor, Y., P.F. Strom, W.J. Farmer. 1996. The effect of sorption on fenanthrene bioavailability. *Journal of Biotechnology*. 51, 227-234.
23. López-Ávila, V., J. Benedicto and K.M. Bauer. 1996. Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *Trends in Analytical Chemistry*. 15, 334-341.
24. Luthy, R.G., G.R. Aiken, M.L. Brusseau, S.D. Cunningham, P.M. Gschwend, J.J. Pignatello, M. Reinhard, S.J. Traina, W.J. Weber, C. Westall. 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminant by geosorbent. *Environmental Science and Technology*. 31, 3341-3347.
25. Mackay, A.A., P.M. Gschwend. 2001. Enhanced concentration of PAHs in groundwater and a coal tar site. *Environmental Science and Technology*. 35, 1320-1328.
26. Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgo para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 39, 27-36.
27. Nieman, J.K.C., R.C. Sims, J.L. Sims, D.L. Sorensen, J.E. Malean, J.A. Rice. 1999. [<sup>14</sup>C] pyrene bound residue evaluation using MIBK fractionation method from creosote-contaminated soil. *Environmental Science and Technology*. 33, 776-781.
28. Northcott, Grant L., and Kevin C. Jones. Validation of Procedures to Quantify Nonextractable Polycyclic Aromatic Hydrocarbon residues in soil. *J. Environ. Qual.* 32, 571 – 582.
29. Perry, R., D. Green, J. Maloney. *Perry's Chemical Engineers Handbook*. Editorial Mc Graw-Hill. New York. 1997.
30. Rogers, S.W., et al. 2002. Natural attenuation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites: Review. *Practice Periodical of Hazardous, toxic, and radioactive waste Management*. 6, 141-155.
31. Spivack S., G. Hurteau, A. Reilly, K. Aldours. 2001. CYP1B1 expresion in human lung. *Drug Metabolism and Disposition*. 29, 916-922.
32. Stellman, J. M., M. McCan. 1998. Hidrocarburos poliaromáticos. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 3° edición. Madrid: Organización

Internacional del Trabajo. Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales-Subdirección general de publicaciones. 310-319.

33. U.S. Environmental Protection Agency. 1995. SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste. Method 3540: Soxhlet extraction.
34. U.S. Environmental Protection Agency. 1996. SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste. Method 3550B: Ultrasonic extraction.
35. U.S. Environmental Protection Agency. 1996. SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Method 3630C: Silica Gel Cleanup.
36. U.S. Environmental Protection Agency. 1999. Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Office of Solid Waste.
37. Voparil, I.M., L.M. Mayer. 2000. Dissolution of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons into the lugworm's (*Arenicola marina*) fluids digestive. *Environmental Science and Technology*. 34, 1221-1228.
38. Wilson, S.C., R.E. Alcock, A.P. Sewart, and K.C. Jones. 1997. Persistence of organic contaminants in sewage sludge-amended soil: A field experiment. *J. Environmental Qual.* 26, 1467-1477.
39. Xing, B., J.J. Pignatello. 1997. Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environmental Science and Technology*. 31, 792-799.
40. Yao, JJ, ZH Huang, SJ Masten. 1998. The ozonation of benzo(a)anthracene. Pathway and product identification. *Water Res.* 32, 3235-3244.
41. Zander, M. 1990. Advances in the theory of benzenoid hydrocarbons. 153, 101-121.

## ANEXOS

**Tabla A. Parámetros cromatográficos: tiempos de retención, ión más abundante, límite de detección y de cuantificación en mg/kg de PAHs.**

PAHs	LOD	LOQ	Tiempo de Retención (minutos)	ión seleccionado (SIM)
Naftaleno	0,02	0,07	7,385	128
Acenaftileno	0,02	0,07	11,138	153
Acenafteno	0,04	0,13	11,546	154
Fluoreno	0,02	0,07	12,585	166
Fenantreno	0,06	0,20	14,401	178
Antraceno	0,04	0,13	14,503	178
Fluoranteno	0,01	0,03	16,593	202
Pireno	0,02	0,07	17,001	202
Benzo[a]antraceno	0,05	0,17	19,091	228
Criseno	0,05	0,17	19,193	228
Benzo[b+k]fluoranteno	0,13	0,43	21,284	252
Benzo[a]pireno	0,13	0,43	22,048	252
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,17	0,57	25,617	276
Dibenzo[a,h]antraceno	0,14	0,47	25,625	278
Benzo[g,h,i]perileno	0,12	0,40	26,535	276

**Tabla B. Propiedades fisicoquímicas de PAHs**

PAHs	Solubilidad en agua (mg/L)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	log Kow	Presión de vapor (Pa)
Naftaleno	31	80,5	218	3,37	10,4
Acenaftileno	16,1	92	265-275	4	0,9
Acenafteno	3,8	96,2	277,5	3,92	0,3
Fluoreno	1,9	116	295	4,18	0,09
Fenantreno	4,57	101	339	3,24	0,02
Antraceno	0,045	216,2	340	4,54	0,001
Fluoranteno	0,26	111	375	5,22	0,00123
Pireno	0,132	156	360	5,18	0,0006
Benzo[a]antraceno	0,011	160	435	5,91	$2,80 \cdot 10^{-5}$
Criseno	0,0028	255	407	1,65	$5,70 \cdot 10^{-7}$
Benzo[b]fluoranteno	0,0015	168	455	5,8	$3 \cdot 10^{-9}$
Benzo[k]fluoranteno	0,0008	217	481	6	$5,2 \cdot 10^{-8}$
Benzo[a]pireno	0,0038	175	495	6,04	$7,00 \cdot 10^{-7}$
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,062	164	530	5,68	-
Dibenzo[a,h]antraceno	0,0006	267	524	6,84	$3,70 \cdot 10^{-10}$
Benzo[g,h,i]perileno	0,00026	277	550	6,5	$1,30 \cdot 10^{-8}$

**Tabla C. Propiedades del biosólido. (Informe Avance Proyecto Fondecyt 1050288, año 2006)**

		Septiembre 2004	Abril 2005	Junio 2005	Enero 2006
<b>Materia Orgánica</b>	%	43	44	48	37
<b>pH (H<sub>2</sub>O) 1:2,5</b>		6.5	6.4	6.6	7.0
<b>N total</b>	g kg <sup>-1</sup>	26	33	27	18
<b>N disponible</b>	mg kg <sup>-1</sup>	1051	5899	5119	6906
<b>total P</b>	g kg <sup>-1</sup>	11.7	10.5	18.6	15.4
<b>P disponible</b>	mg kg <sup>-1</sup>	933	489	499	559
<b>E.C.</b>	dS m <sup>-1</sup>	6.8	24	19	21
<b>CEC</b>	cmol kg <sup>-1</sup>	48.1	34.4	36.7	35.5

**Tabla D. Propiedades del suelo de estudio. (Informe Avance Proyecto Fondecyt 1050288, año 2006)**

		Coyuncaví Bajo	Miraflores	El Maitén	La Paloma
<b>Materia Orgánica Total</b>	%	4.6	5.0	7.5	2.1
<b>Materia Orgánica Oxidable</b>	%	3.2	3.1	4.7	1.2
<b>pH (H<sub>2</sub>O) 1:2,5</b>		7.2	6.4	7.9	6.7
<b>N total</b>	g kg <sup>-1</sup>	2.0	2.0	2.4	0.75
<b>N disponible</b>	mg kg <sup>-1</sup>	16	41	25	17
<b>Total P</b>	g kg <sup>-1</sup>	5.5	6.9	7.2	5.9
<b>P disponible</b>	mg kg <sup>-1</sup>	31	54	37	33
<b>CEC</b>	cmol kg <sup>-1</sup>	48.1	34.4	36.7	35.5
<b>E C</b>	dS m <sup>-1</sup>	0.087	0.20	0.32	0.085
<b>Arcilla</b>	%	16	21	17	7,8
<b>Limo</b>	%	13	16	21	4,0
<b>Arena</b>	%	71	63	62	88