

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



***“EXTRACCION CUANTITATIVA DE BIFENILOS
POLICLORADOS DESDE AGUAS Y DE SU FRACCION
BIODISPONIBLE EN SUELOS MEDIANTE SORCION EN UN
DISPOSITIVO DE DISCO ROTATORIO”***

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

Por:

CLAUDIO ANDRES LEIVA MIRANDA

Directores de Tesis

Dr. Pablo Richter Duk
MgQ. Inés Ahumada Torres

SANTIAGO- CHILE
2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

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

CLAUDIO ANDRES LEIVA MIRANDA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2014.

Directores de Tesis:

Dr. Pablo Richter Duk _____

MgQ. Inés Ahumada Torres _____

Comisión Informante:

Dra. María Inés Toral (Presidente) _____

Dr. Jorge Mendoza _____

Dra. María Angélica Rubio _____

Dr. Rodrigo Segura _____

Dedicada
a mi hijo Miguel Antonio
a mis padres Leopoldo y Rosa
a mi Señora Adriana

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mis profesores y directores de tesis Pablo Richter D. e Inés Ahumada T. por haberme recibido por segunda vez en el laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por entregarme su confianza y apoyo durante los años de permanencia en el doctorado y sobre todo por su valiosa ayuda en mi formación profesional e investigadora.

A mi familia, en especial a mi señora Adriana, por su compañía, amor, entrega y entendimiento durante todo este periodo. A mi hijo Miguel Antonio, por toda su compañía, alegría y felicidad que me entregas cada día mediante tus sonrisas, caricias y rabieta.

A mis padres, Rosa y Leopoldo, agradecerles por todo el cariño y por su apoyo incondicional que me han entregado durante todo este periodo,

A mi hermana Karla Leiva y a Alejandro Cañas, por su gran apoyo y compañía tanto en la universidad como en el laboratorio y fuera de ellos.

A Leopoldo, Sanja, Hallgrimur y Elinbjörg, que desde la distancia me han entregado todo su cariño, comprensión y fuerza para terminar este trabajo.

A mis amigos Adolfo Marican, Mauricio Retamal, Jorge Rivas, Ady Giordano, Loreto Ascar, y Betsabet Sepúlveda, sinceramente agradecerles por toda su compañía, comprensión, el ánimo entregado en todo momento haciendo más llevadera y entretenida las tardes de trabajo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A Carlos Muñoz, Aliosha Bazaes y Guillermo Alcántara, muchas gracias por toda su compañía y comprensión en estos momentos en que termina una etapa y comienzas varios caminos para el futuro.

A todos los integrantes que han pasado en el Laboratorio de Química Ambiental de la facultad, gracias por haberme acompañado y apoyado en todo momento.

A la comisión evaluadora de esta tesis por el gran interés mostrado, además de agradecer por todo su tiempo empleado en leerla, corregirla y entregarme sus sugerencias las cuales contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

Finalmente agradecer a CONICYT por los financiamientos de la beca para la realización de doctorado periodo 2010, a la beca de apoyo a la realización de tesis doctoral N° 24110075, a la beca de asistencia a congresos y cursos cortos segunda convocatoria 2012 y a los proyectos Fondecyt 1100085 y 1110115, que gracias a su apoyo esta tesis se pudo realizar sin mayor inconveniente y ser presentada a en diversas instancias.

Resumen

Los bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos orgánicos sintéticos considerados altamente peligrosos, cuyo uso fue prohibido durante la década de 1970. Debido a su presencia en diversas matrices medioambientales y a la capacidad que tienen de bioacumularse, se hace necesaria su determinación rápida y confiable. Con este propósito, se han desarrollado diversas técnicas basadas en la extracción sólido-líquido, con el inconveniente empleo de grandes cantidades de solventes. Con el propósito de disminuir el alto uso de solventes y aumentar la eficiencia de las actuales técnicas de extracción de PCBs, se propone el uso de una metodología de micro-extracción en fase sólida, en la forma de disco rotatorio (RDSE) recubierto con distintas fases de extracción/preconcentración como PDMS (Polidimetilsiloxano), PMVQ (Fenil vinil metil polisiloxano), C18 y MWCNT (Nanotubos de carbono de multi pared) para el tratamiento de muestras acuosas y posterior cuantificación a través de cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica (GC-ECD), además del uso de detector de masas para confirmación de las señales cromatográficas.

Se optimizaron las variables que afectan el proceso de extracción de los analitos desde muestras acuosas, como tiempo de agitación, cantidad de metanol y cloruro de sodio, además del volumen de muestra. Se aplicó el diseño experimental “compuesto central entrado en las caras” para el estudio de la cantidad de metanol y cloruro de sodio, a través de la superficie de respuesta múltiple o deseabilidad de Derringer se obtuvieron valores óptimos de 20% de metanol y 0% de NaCl. Respecto volumen de muestra, se encontró mayor eficiencia con 10 mL., siempre utilizando una velocidad de rotación constante de 1250 rpm., y 45 minutos de desorción con metanol. Con las condiciones anteriores, se estudió el tiempo de extracción, obteniéndose 200 min. para PDMS, 120 min. para C18, 80 min. para MWCNT y 100 min. para PVMQ. Una vez obtenidas las condiciones optimizadas, se obtuvieron porcentajes de recuperación de PCBs desde un 52,8% hasta un 112,2% dependiendo de la fase usada para la extracción y del tipo de PCBs estudiado.

Teniendo optimizada la etapa de extracción, posteriormente se utilizó RDSE con PDMS en una de sus caras, para determinar la biodisponibilidad de PCBs desde muestras de suelo, en este caso el suelo fue lixiviado con CaCl_2 0,01 M. durante un período de 2000

minutos a 150 rpm en un agitador recíproco en una relación de 1:2 (suelo : solución extractante), para posteriormente ser centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm separando el suelo del sobrenadante, en este último se introduce el disco de teflón recubierto en una de sus caras con PDMS y se extraen los PCBs mediante las condiciones de trabajo optimizadas en la etapa anterior (10 mL de muestra, 200 min. de agitación, 20% metanol y 0% de cloruro de sodio). Este proceso se validó con la cantidad de PCBs absorbidos por plantas de trigo, a las que se les extrajo los PCBs mediante extracción con ultrasonido y posterior limpieza con ácido sulfúrico concentrado, obteniéndose buenas correlaciones lineales para la mayoría de los analitos de interés, siendo el método propuesto en esta investigación, una propuesta adecuada para la estimación de la de la fracción biodisponible de bifenilos policlorados en muestras de suelo mediante el uso de RDSE con PDMS como fase extractante.

Quantitative extraction of polychlorinated biphenyls from waters and soils bioavailable fraction by sorption on a rotating disk device.

Summary

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of synthetic organic compounds considered *highly dangerous*, which have been banned at the end of the 1970s. Due to their presence in various environmental matrices and their ability to *bioaccumulate*, it is necessary to develop rapid and safe analytical methods for their determination. As a result, in liquid samples several techniques have been developed based mainly on solid-phase extraction, to replace the liquid-liquid extraction techniques developed earlier. In order to diminish the high use of solvent and increase efficiency of current extraction techniques of PCBs, the use of a solid-phase microextraction is proposed in this work using a rotating-disk sorptive extraction (RDSE) device covered with different low-polarity sorptive phases for extraction and preconcentration of PCBs. The assayed phases were: polydimethylsiloxane (PDMS), phenyl methyl vinyl silicone (PMVQ), octadecyl modified silica (C18) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). This method was developed for the treatment of aqueous samples, and the different analytes were determined by gas chromatography (GC) with electron capture detector (ECD). In addition a selective mass detector was used for confirmation purposes.

The variables affecting the extraction process were optimized such as: stirring time, quantity of methanol and sodium chloride as matrix modifiers, and sample volume. An experimental design, called central composite face-centered (CCF) was applied, to study the quantity of methanol and sodium chloride. Using Derringer's multi-response surface method, the optimal values were of 20% of methanol and 0% of NaCl. With respect to sample volumes, it was found that for 10 mL the extraction was more efficient always using a constant rotational velocity of the disk of 1250 rpm and 45 min of analyte desorption with methanol. Under these conditions, the extraction time profile for the analytes were obtained, with equilibrium times of 200 min for PDMS, 120 min for C18, 80 min for MWCNT and 100 min for PMVQ. Once this condition was achieved, recoveries of

the PCBs were obtained from 52.8% to 112.2% depending on the extraction phase used and PCB's type studied.

RDSE with a phase of PDMS was used to determine the bioavailability of PCBs in soil samples. In this case, the soil was leached with 0.01 M CaCl₂ during 2000 min to 150 rpm in a reciprocal shaker with a 1:2 ratio (soil: extraction solution) and later it was centrifuged for 10 min to 2500 rpm. After centrifugation, a rotating Teflon disk coated with a PDMS film on one of its surfaces was included and finally PCBs are extracted through the previously selected conditions. (10 ml of sample, 200 min of stirring, 20% methanol and 0% sodium chloride). A good linear correlation between the results obtained through this method with those obtained by determining the amount of PCBs absorbed by wheat plants. Consequently the proposed biomimetic method is a good proposal to determine the bioavailable fraction of PCBs in soil samples using the RDSE with PDMS as extraction phase.

ÍNDICE DE CONTENIDO

		Página
	Capítulo I: Introducción.	1
1.1	Bifenilos policlorados.	2
1.2	Propiedades de los PCBs.	2
1.3	Usos de los PCBs.	4
1.4	Fuentes de Contaminación de PCBs.	4
1.5	Efectos sobre la salud y el medio ambiente.	6
1.6	Situación en Chile.	8
1.7	Biodisponibilidad	9
1.8	Desarrollo de métodos analíticos.	11
1.9	Extracción total desde matrices acuosas.	12
1.10	Extracción de la fracción biodisponible de PCBs en suspensión acuosa de suelo.	17
	Capítulo II.	21
II	Hipótesis.	22
III	Objetivos.	23
3.1	Objetivos generales.	23
3.2	Objetivos específicos.	23
	Capítulo III.	24
IV	Materiales y Métodos.	25
4.1	Reactivos.	25
4.2	Materiales.	25
4.3	Equipos.	26
V	Métodos.	27
5.1	Procedimiento de extracción y elución.	27
5.2	Estudio de adición de NaCl y MeOH.	27
5.3	Estudio del tiempo de agitación.	28
5.4	Estudio de volumen de muestra.	28
5.5	Determinación mediante GC-ECD.	29
5.6	Determinación mediante GC.MS.	29
5.7	Límites de detección y cuantificación.	30
5.8	Estudio de biodisponibilidad.	30
5.9	Muestras de suelo.	31

5.10	Muestras de biosólido.	31
5.11	Caracterización de suelos y biosólido.	31
5.11.1	Determinación de pH.	31
5-11.2	Determinación de carbono orgánico.	31
5.11.3	Determinación de capacidad de intercambio catiónico.	32
5.12	Ensayos de invernadero.	32
5.13	Preparación de las muestras de planta.	33
5.14	Estudio biosimulador en mezclas suelo-biosólido.	33
5.15	Extracción de PCBs desde plantas.	35
5.16	Clean-up de extractos de plantas.	36
	Capítulo IV.	38
VI	Resultados y discusión.	39
6.1	Selección de los analitos.	39
6.2	Determinación cromatográfica de los analitos.	40
6.2.1	Cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica.	40
6.2.2	Cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas.	41
6.3	Curva de calibración.	45
6.4	Límites de detección y cuantificación.	46
6.5	Optimización de las variables que afectan a la determinación de PCBs en muestras acuosas mediante discos recubiertos con distintas fases de extracción.	47
6.5.1	Estudio del efecto del % metanol y % NaCl.	47
6.5.2	Estudio de distintas fases de extracción.	54
6.5.3	Estudio del volumen de muestra.	69
6.6	Aplicación de RDSE en muestras reales.	75
6.7	Estudio de biodisponibilidad de PCBs en sistema suelo-biosólido.	76
6.7.1	Caracterización del suelo.	76
6.7.2	Estudio del tiempo de lixiviación.	77
6.7.3	Estudio con plantas de trigo.	81
6.7.3.1	Extracción desde las muestras de plantas.	81
6.7.3.2	Limpieza de las muestras o "Clean up".	81
6.8	Comparación de las concentraciones obtenidas por los dos métodos de determinación de biodisponibilidad de PCBs en suelos y plantas.	85

	Capítulo V.	87
VII	Conclusiones.	88
	Capítulo VI.	90
VIII	Referencias.	91
	Capítulo VII.	101
	Anexos.	102

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1	Fórmula molecular, masa molecular, cantidad de isómeros, solubilidad en agua y Log K_{OW} de los diversos congéneres de los PCBs. 3
Tabla 2	Cantidad de PCBs en litros por Región en nuestro país al año 2004. 8
Tabla 3	Condiciones experimentales del Diseño de Compuesto Central usado en la optimización de las variables %NaCl y %MeOH. 27
Tabla 4	Condiciones experimentales codificadas y naturales de las variables %NaCl y %MeOH estudiadas para la extracción de los PCBs en estudio desde matrices acuosas. 28
Tabla 5	iones de cuantificación y confirmación para los distintos PCBs en estudio y para el estándar interno. 30
Tabla 6	Dosis de biosólido y cantidad de macetas usadas en el estudio de biodisponibilidad. 32
Tabla 7	Número y nombre IUPAC, homólogo al que pertenecen y TEF de los 12 PCBs seleccionados para el estudio de esta tesis. 39
Tabla 8	Valores de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación de las curvas de calibración para cada uno de los PCBs. 45
Tabla 9	Límites de detección y cuantificación y tiempos de retención para cada uno de los analitos estudiados. 46
Tabla 10	Tiempos de equilibrio para la extracción de PCBs mediante las distintas fases de extracción. 60
Tabla 11	Valores de área BET de las diferentes fases usadas en RDSE. 64
Tabla 12	Comparación de las recuperaciones (%) obtenidas mediante disco rotatorio con las distintas fases usadas para extraer. 68
Tabla 13	Comparación de los tiempos de extracción en 50 mL y 10 mL de muestra, de las distintas fases adheridas al disco rotatorio (PDMS, C18, MWCNT) y PMVQ a velocidad constante de 1250 rpm. 73
Tabla 14	Comparación de los porcentajes de recuperación de algunos PCBs para las distintas fases a los dos volúmenes de muestra estudiado. 73
Tabla 15	Precisión de la metodología utilizando distintas fases para el mismo disco (n=3) y distinto disco (n=9) expresadas como 74

	coeficiente de variación.	
Tabla 16	Concentración de los PCBs en las muestras de los afluentes de las distintas plantas de tratamiento de agua de la ciudad de Santiago.	76
Tabla 17	Caracterización del suelo y biosólido usado para el estudio de biodisponibilidad.	76
Tabla 18	Recuperaciones de los distintos PCBs después de la etapa de "Clean-up".	81
Tabla 19	Correlación entre los porcentajes de absorción obtenidos mediante planta de trigo y RDSE.	86

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fórmula estructural de los PCBs.	3
Figura 2	Recuperaciones teóricas versus $\text{Log}K_{\text{PDMS,W}}$ a diversas razones de volumen agua sobre PDMS.	14
Figura 3	Dispositivo utilizado en RDSE.	15
Figura 4	Imágenes del sistema, vial y disco usado en RDSE.	16
Figura 5	Diagrama de la capa estacionaria de agua que se forma sobre el PDMS.	17
Figura 6	Clasificación de la planta de trigo usada en el estudio de biodisponibilidad.	31
Figura 7	Diagrama de la metodología biosimuladora mediante un método de lixiviación basado en la norma ISO/TS 21268-1 y su posterior etapa de sorción en RDSE.	34
Figura 8	Diagrama del proceso de extracción de PCBs desde las muestras de plantas de trigo basado en el método EPA 3635C.	35
Figura 9	Diagrama del método de limpieza usado para las muestras de plantas de trigo basado en el método EPA 3665A.	37
Figura 10	Cromatograma de los 12 PCBs que se han utilizado para los estudios de optimización.	40
Figura 11	A) Cromatograma TIC de los 12 PCBs en estudio y B, C, D y E corresponden a los cromatogramas extraídos de los 12 PCBs a sus correspondientes iones de cuantificación.	43
Figura 12	Espectro de masas correspondiente a los 12 PCBs en estudio agrupados de acuerdo a los iones de cuantificación de cada congénere A) TeCBp, B) PCBp, C) HCBp, D) HeCBp.	44
Figura 13	Cromatograma de una curva de calibración de los 12 PCBs a concentraciones de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.	45
Figura 14.A	Diagramas de Pareto estandarizado para los PCBs 77, 114 y 118.	49
Figura 14.B	Diagramas de Pareto estandarizado para los PCBs 126, 157 y 167.	50
Figura 15.A	Superficies de respuesta estimadas para los efectos de NaCl y metanol para los PCBs 77, 81 y 114.	51
Figura 15.B	Superficies de respuesta estimadas para los efectos de NaCl y	52

	metanol para los PCBs 126, 157 y 167.	
Figura 16	Superficie de respuesta múltiple estimada para la extracción de PCBs desde matrices acuosas.	54
Figura 17	Diversas fases adheridas al disco de teflón, de izquierda a derecha, C18, PDMS y MWCNT.	55
Figura 18.A	Perfiles de extracción para PCB 77 en las diversas fases de extracción.	57
Figura 18.B	Perfiles de extracción para PCB 118 en las diversas fases de extracción.	58
Figura 18.C	Perfiles de extracción para PCB 167 en las diversas fases de extracción.	59
Figura 19	Diseño del nuevo dispositivo de RDSE para el uso con MWCNT.	61
Figura 20.A	Perfiles de extracción de los distintos PCBs (77, 114, 118/123) representativos mediante el nuevo dispositivo de disco rotatorio con MWCNT.	62
Figura 20.B	Perfiles de extracción de los distintos PCBs (126, 157, 167) representativos mediante el nuevo dispositivo de disco rotatorio con MWCNT.	63
Figura 21.A	Perfiles de extracción para algunos PCBs representativos (77, 114, 118) mediante el uso de la fase PVMQ sobre disco rotatorio.	65
Figura 21.B	Perfiles de extracción para algunos PCBs representativos (126, 157, 167) mediante el uso de la fase PVMQ sobre disco rotatorio.	66
Figura 22	Micrografías SEM de las fases PDMS (Izquierda) PMVQ (derecha) usadas en RDSE aumentadas 100X, 500, 1000X y 3000X.	67
Figura 23.A	Perfiles de extracción para el PCB 77 usando las diversas fases de extracción a 10 mL. de muestra.	70
Figura 23.B	Perfiles de extracción para el PCB 118 usando las diversas fases de extracción a 10 mL. de muestra.	71
Figura 23.C	Perfiles de extracción para el PCB 77 usando las diversas fases de extracción a 10 mL. de muestra.	72
Figura 24	Comparación de las extracciones de PCBs en agua potable y MilliQ ambas enriquecidas a $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a un tiempo de extracción de 200 minutos.	75
Figura 25	Perfiles de tiempo de lixiviación de los distintos PCBs mediante el	78

	uso de la metodología de extracción basado en la norma ISO/TS 21268-1 y su posterior extracción mediante RDSE.	
Figura 26	Concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los PCBs obtenidos mediante RDSE en lixiviados de suelos.	79
Figura 27	Extracción de PCBs desde los lixiviados de las distintas mezclas suelo-biosólidos mediante RDSE.	80
Figura 28	Limpieza de los extractos de plantas mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado (método EPA3665A).	82
Figura 29	Cromatograma del extracto de una muestra de raíz de trigo en suelo enriquecido a $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$.	83
Figura 30	Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los diversos PCBs en raíz de las plantas de trigo, cultivadas en el suelo Taqueral enmendado con 0, 30, 90 y $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de biosólido.	84
Figura 31	% de PCBs sorbidos por las raíces de las plantas de trigo.	85

Abreviaciones

ASE	: Extracción con solvente acelerado.
CBp	: Monoclorobifenilo.
CIC	: Capacidad de intercambio catiónico.
COPs	: Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs).
DCBp	: Diclorobifenilo.
DCC	: Diseño compuesto central.
DDD	: Diclorodifenildicloroetano.
DDE	: Diclorodifenildicloroetileno.
DDT	: Diclorodifeniltricloroetano.
DeCBp	: Decaclorobifenilo.
US-EPA	: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos.
HCB	: Hexaclorobenzeno.
HCBp	: Hexaclorobifenilo.
HeCBp	: Heptaclorobifenilo.
IUPAC	: Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada.
LLE	: Extracción líquido-líquido.
MAE	: Extracción asistida con microondas (Microwave assisted extraction).
MWCNT	: Nanotubos de carbono de multi pared (Multiwall carbón nanotubes).
NCBp	: Nonaclorobifenilo.
OCBp	: Octaclorobifenilo.
PAHs	: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
PBDE	: Bifenil éter poli bromados.
PCBs	: Bifenilos policlorados.
PCBp	: Pentaclorobifenilo.
PCDD/F	: Policlorodibenzodioxina/Policlorodibenzofurano.
PDMS	: Polidimetilsiloxano (Polydimethylsiloxane).
PMVQ	: Fenil vinil metil polisiloxano (phenyl vinyl methyl polisiloxane).
PTA	: Planta de tratamiento de aguas.
RDSE	: Extracción por sorción en disco rotatorio (Rotatory disk sorbent extraction).
SEC	: Súper intendencia de Electricidad y Combustibles.
SFE	: Extracción con fluidos supercríticos.
SBSE	: Extracción por sorción en barra de agitación (Stir bar sorbent extraction).

SPE : Extracción en fase sólida.
SPME : Microextracción en fase sólida.
SRE : Extracción con vara de silicona (Silicone rod extraction).
TCBp : Triclorobifenilo.
TeCBp : Tetraclorobifenilo.
UAE : Extracción asistida con ultrasonido.
WHO : Organización Mundial de la Salud (World Health Organization).

Capítulo I

Introducción

I. INTRODUCCION

1.1 - Bifenilos Policlorados

Los bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos orgánicos sintéticos con características similares al dicloro difenil tricloroetano (DDT). Éstos fueron sintetizados comercialmente por cloración catalítica de los anillos de bifenilo, produciendo una mezcla compleja de múltiples isómeros con diferentes grados de cloración, obteniéndose un total de 209 compuestos llamados congéneres. Los PCBs con el mismo número de átomos de cloro son conocidos como homólogos, y los homólogos con átomos de cloro en distintas posiciones son llamados isómeros.

Los PCBs fueron generados desde 1930 hasta 1970, produciéndose una mezcla compleja que contenía de 60 a 90 congéneres. Éstos fueron usados en un amplio rango de aplicaciones industriales debido a sus excelentes propiedades físicas y químicas.

La persistencia medioambiental de los PCBs resulta principalmente de la incapacidad de la biota tanto del agua como del suelo para degradar estos compuestos en una proporción significativa. Por esta razón, es que los PCBs han permanecido en suelos y cuerpos de aguas por muchos años, además debido a su naturaleza lipofílica estos compuestos se pueden bioacumular en las células entrando de esta forma en la cadena alimentaria.

Debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación, estos compuestos han sido prohibidos o restringidos, y algunos de ellos, han sido incluidos en la lista de contaminantes principales en muchos países. [1 – 3]

1.2 - Propiedades de los PCBs

Su fórmula molecular es $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ donde “n” representa la cantidad de átomos de cloro presente en la molécula, la estructura base de los PCBs, se muestra en la Figura 1.

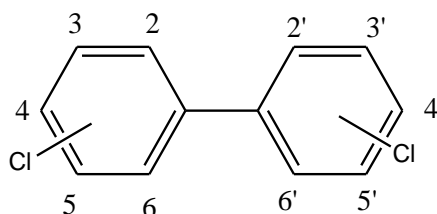


Figura 1: Fórmula estructural de los PCBs.

Su producción se realiza mediante cloración catalítica de los anillos de bifenilo, generando una mezcla compleja de compuestos con masas moleculares que van desde los 188 a 498 g·mol⁻¹, dependiendo del número de átomos de cloro unidos a los anillos de bifenilo, como se puede observar en la Tabla 1. Los congéneres tóxicos tienen entre 5 y 10 átomos de cloro, principalmente en las posiciones para y meta, sin embargo, los congéneres sustituidos en las posiciones orto-3,4 son considerados los más tóxicos.

Tabla 1: Fórmula molecular, masa molecular, cantidad de isómeros, solubilidad en agua y Log K_{OW} de los diversos congéneres de los PCBs. [4]

	Fórmula Molecular	Masa Molecular	Nº Isómeros	Solubilidad en agua [mg·L ⁻¹]	Log K _{ow}
Monoclorobifenilo (CBp)	C ₁₂ H ₉ Cl ₁	188,7	3	1,2 – 5,5	4,3 – 4,6
Diclorobifenilo (DCBp)	C ₁₂ H ₈ Cl ₂	233,1	12	0,06 – 2	4,9 – 5,3
Triclorobifenilo (TCBp)	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	257,5	24	0,015 – 0,4	5,5 – 5,9
Tetraclorobifenilo (TeCBp)	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	292,0	42	0,0043 – 0,010	5,6 – 6,5
Pentaclorobifenilo (PCBp)	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	326,4	46	0,004 – 0,02	6,2 – 6,5
Hexaclorobifenilo (HCBp)	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	360,9	42	0,0004 – 0,0007	6,7 – 7,3
Heptaclorobifenilo (HeCBp)	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	395,3	24	0,000045 – 0,0002	6,7 – 7,0
Octaclorobifenilo (OCBp)	C ₁₂ H ₂ Cl ₈	429,8	12	0,0002 – 0,0003	7,1
Nonaclorobifenilo (NCBp)	C ₁₂ H ₁ Cl ₉	464,2	3	0,00018 – 0,0012	7,2 – 8,16
Decaclorobifenilo (DeCBp)	C ₁₂ Cl ₁₀	498,7	1	0,000001 – 0,0000761	8,26

Las propiedades de los PCBs dependen del grado de cloración que presenten los compuestos, así las moléculas levemente cloradas tales como CBp, DCBp, TCBp y TeCBp tienden a ser líquidos aceitosos e incoloros, los PeCBp son pesados y de aspecto viscoso muy similar a la miel, mientras que los altamente clorados (desde HCBp hasta DeCBp) son sustancias con aspecto de grasa o cera. Su punto de inflamación puede ser tan bajo como 140°C, sin embargo en la mayoría de los PCBs no se ha determinado su punto de inflamación, ya que no pueden ser medidos por las pruebas estándar. El vapor es invisible y tiene un fuerte olor característico.

Los PCBs son poco solubles en agua y, extremadamente solubles en grasas y aceites. Su solubilidad en agua disminuye con el incremento del grado de cloración. Los rangos van desde los 5,5 mg·L⁻¹ para CBp hasta 7,6·10⁻⁵ mg·L⁻¹ para el DeCBp, pero la solubilidad también puede variar entre congéneres con la misma cantidad de átomos de cloro, como por ejemplo para el PCBp, que posee 46 isómeros, presenta un rango de solubilidades entre 0,004 y 0,02 mg·L⁻¹.

1.3 - Usos de los PCBs.

Las propiedades de los PCBs que los hicieron importantes para aplicaciones industriales, incluyen estabilidad térmica, inercia química, no inflamabilidad, alta resistividad eléctrica o baja constante dieléctrica. Durante mucho tiempo los PCBs fueron usados en un amplio rango de aplicaciones industriales como, aceite en transformadores, sistemas de transferencia de calor y sistemas hidráulicos.

También fueron ampliamente usados en lubricantes para bombas y turbinas, en la formulación de aceite de corte para el tratamiento de metales, en aplicaciones como plastificantes, recubrimientos, aislantes y adhesivos, pesticidas, tintas, colorantes y ceras entre otros. [1 – 3]

1.4 - Fuentes de Contaminación de PCBs.

Aunque no se conocen fuentes de contaminación naturales de PCBs, estos contaminantes se pueden encontrar en diversas matrices medioambientales, como por ejemplo, en aguas, suelos, aire, sedimentos de ríos, lagos y mares además de los biosólidos, que son utilizados como enmienda de suelos agrícolas. Estos compuestos

llegan al medioambiente durante su producción, uso y eliminación; desde derrames accidentales, fugas durante su transporte, y por la aplicación de biosólidos al suelo.

Generalmente los biosólidos contienen elevada cantidad de materia orgánica, y una amplia variedad de macro y micronutrientes que puede otorgar beneficios al suelo. Los biosólidos sirven como una excelente fuente de nutrientes para las plantas, y los constituyentes orgánicos otorgan propiedades beneficiosas para el acondicionamiento del suelo, además aumenta el rendimiento de muchos cultivos y también, pueden mejorar las propiedades físicas del suelo como la porosidad, estabilidad, densidad, y de retención de agua. Sin embargo, los biosólidos, pueden contener microorganismos patógenos y contaminantes inorgánicos tales como metales pesados, y orgánicos, como detergentes, pesticidas, PAHs, PCBs, PBDEs, entre otros, que pueden causar daño al sistema suelo-planta y además puede provocar un grave riesgo para la salud de los seres vivos.

Como los biosólidos son los subproductos líquidos, semisólidos y sólidos que se generan durante el tratamiento de aguas servidas y los contaminantes orgánicos, tienden a sorberse en estos sólidos suspendidos es que normalmente, los biosólidos, contienen concentraciones significativas de diferentes tipos de estos contaminantes, los cuales, su concentración puede variar entre los $\text{pg}\cdot\text{kg}^{-1}$ hasta $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, dependiendo del tipo de agua residual, que reciban las plantas de tratamiento (domésticos, industriales, etc.)

Debido a la toxicidad de estos compuestos, se hace necesaria su determinación rápida y confiable tanto en muestras de agua, como en muestras de suelos, biosólidos y plantas cultivadas en suelos enmendados con biosólidos.

La aplicación de biosólidos a los suelos de uso agrícola se encuentra limitado por las concentraciones de metales pesados tanto en suelos como en biosólidos, en la actualidad, no existe una norma similar para los contaminantes orgánicos, sin embargo en el año 1992, en Alemania, se estableció un límite de $200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ solo para un grupo de 6 congéneres de PCBs (28, 52, 101, 138, 153 y 180) en biosólidos que se usarían con propósito agrícola. Por otra parte, este mismo reglamento, se establece un límite en la aplicación de biosólidos de $5 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en el plazo de 3 años. [5 – 10]

Los PCBs son compuestos semivolátiles, lo que les permite vaporizarse o ser adsorbidos sobre partículas suspendidas en aerosoles atmosféricos, dando lugar al transporte a larga distancia desde regiones cálidas a frías del planeta. La importancia de este tipo de transporte es, que es uno de los mecanismos de distribución de los efectos de persistencia, bioacumulación, y bioconcentración a través del planeta, dando como resultado la detección de niveles de contaminación por acción de estos contaminantes, en lugares alejados de las fuentes de emisión, tales como los Polos. La combustión e incineración de desechos peligrosos, sólo corresponde a una porción significativa de la emisión de PCBs al aire, encontrándose a estos compuestos en la atmósfera, tanto en forma de partículas o como de vapor.

En agua, las concentraciones de PCBs generalmente son mayores que en zonas aéreas cercanas a la actividad humana o cerca de la costa. La principal fuente de PCBs en aguas superficiales es por el vertido directo de líquidos que contienen estos compuestos, incorporándose a sedimentos, suelos y aire, a través del ciclo medioambiental. Debido a su carácter lipofílico se asocian rápidamente a microorganismos como algas y protozoos, además los sedimentos pueden actuar como reserva de éstos, los cuales podrían liberarse en pequeñas cantidades y ser acumulados en los animales marinos [12].

Los PCBs se enlazan fuertemente a la materia orgánica presente en el suelo y pueden permanecer por mucho tiempo unido a él. El transporte transfronterizo de los PCBs, mecanismos por el cual es posible distribuir los efectos de persistencia y bioacumulación de los compuestos orgánicos persistentes, es el responsable de la disposición de estos compuestos en lugares alejados a los sitios de disposición y derrames.

Se ha encontrado que puede ocurrir exposición a estos compuestos, durante la reparación y mantenimiento de transformadores y condensadores que poseen PCBs en su interior, también a través de incendios, derrames o disposición de materiales que contienen PCBs. [1, 10, 11]

1.5 - Efectos sobre la salud y el medio ambiente

Los PCBs tienen una baja a moderada toxicidad, ensayos ecotoxicológicos con animales tratados muestran un LD₅₀ que va desde 0,5 g·kg⁻¹ hasta 11,3 g·kg⁻¹ de masa corporal.

Muchos de los efectos estudiados son el resultado de la exposición repetitiva y crónica de humanos y animales a estos compuestos.

Los PCBs son absorbidos por los seres humanos y animales a través de la piel, pulmones, y el tracto gastrointestinal. Una vez al interior del cuerpo, éstos son transportados mediante el sistema sanguíneo al hígado, a los músculos y al tejido adiposo donde se bioacumulan. Estos compuestos pueden causar una variedad de efectos adversos en la salud dependiendo de la ruta de exposición, edad, sexo y área del cuerpo, en que los PCBs se encuentran concentrados. Estudios en animales muestran que estos compuestos son cancerígenos. Animales que consumieron alimentos que contenían elevadas cantidades de PCBs por períodos cortos de tiempo, tenían leves daños hepáticos, incluso algunos de ellos murieron. Estos compuestos también han sido considerados como causa de mortalidad masiva de aves marinas.

Además de los estudios en animales, se han realizado una serie de estudios en trabajadores que estuvieron expuestos a los PCBs, estos trabajadores mostraron un aumento en cáncer al hígado. La exposición a altas concentraciones de PCBs puede tener efectos agudos que incluyen enfermedades a la piel (cloracne), daño hepático (hepatitis), además de otros efectos no cancerígenos a corto plazo, como pérdida de peso corporal, daño clínicamente diagnosticado en la función inmunológica y en el sistema nervioso central, causando dolor de cabeza, mareos, depresión y fatiga. Otros efectos adversos que provocan estos compuestos en la salud son problemas gástricos y en las glándulas tiroideas, además de alteraciones en el comportamiento y en el sistema reproductor.

Los PCBs pueden afectar la productividad y composición de las comunidades de fitoplancton, el cual es el alimento principal de los organismos marinos. La transferencia de los PCBs en la cadena alimentaria desde el fitoplancton a los invertebrados, peces y mamíferos puede dar lugar a la exposición humana a través del consumo de los alimentos que contienen PCBs. [1 – 3]

1.6 - Situación en Chile

En Chile, los PCBs se encuentran prohibidos para su uso como fluidos dieléctricos en transformadores y condensadores nuevos, en virtud de la resolución exenta N° 610/1892 de la superintendencia de electricidad y combustibles (SEC).

En nuestro país, si un transformador contiene una concentración menor a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de PCBs en su refrigerante, éste se considera “libre de PCBs”, es decir, esta concentración no presenta riesgo para el medio ambiente, ni para el personal que los debe mantener. [12]

El año 2004, se realizó el Inventario nacional de PCBs en el cual se consideró sólo las sustancias usadas como fluidos dieléctricos en transformadores y condensadores. El principal uso de los PCBs en nuestro país, ha sido como aceite refrigerante de transformadores de media y alta tensión, que en algunos casos puede presentar fugas por falta de mantención.

El volumen total de PCBs declarados por las empresas chilenas e inventariadas por la CONAMA, alcanza un valor de 569.547 litros de PCBs. De estos 327.005 litros están actualmente en uso y 242.545 litros se encuentran almacenados, tal como se puede ver en la Tabla 2 [12].

Tabla 2: Cantidad de PCBs en litros por Región en nuestro país al año 2004 (CONAMA).

Región	Uso	Almacenado	Total
I	699	22	721
II	62.014	156.408	218.422
III	10.766	56.266	67.034
IV	7.745	681	8.462
V	12.132	250	12.382
VI	44.944	742	45.686
VII	0	173	173
VIII	80.645	20.378	101.023
IX	450	0	450
X	60	0	60
XI	0	0	0
XII	30.314	2.616	32.930
RM	77.235	5.005	82.240
Total	327.005	242.542	569.547

La Tabla 2 muestra que las Regiones II y III son las que presentan la mayor cantidad de PCBs almacenados, mientras que la RM, V, VI, VIII y XII son las Regiones que presentan mayores volúmenes de PCBs en uso, considerando las regiones mencionadas anteriormente, éstas son las que poseen la mayor cantidad de PCBs en el país representando el 98% del total nacional.

En cuanto a la eliminación de estos compuestos, nuestro país no cuenta con incineradores de alta tecnología o vertederos de alta seguridad para la eliminación o disposición de los PCBs. [11,13]

1.7 - Biodisponibilidad

Existen diversas definiciones del término biodisponibilidad. Los ambientalistas consideran la biodisponibilidad como la representación de la accesibilidad de un compuesto químico para su asimilación en un organismo vivo. Desde este punto de vista, se define un compuesto biodisponible como aquel que está libre para cruzar la membrana celular de

un organismo, a partir del medio donde se encuentra en un tiempo determinado. Una vez que la transferencia a través de la membrana se ha producido, el almacenamiento, la transformación, la asimilación o degradación puede tener lugar dentro del organismo, en cambio un compuesto potencialmente biodisponible según Semple [14] es aquel que está disponible para cruzar la membrana celular de un organismo.

En el caso de un contaminante orgánico mientras más biodisponible sea, mayor será su efecto nocivo sobre los seres vivos. La biodisponibilidad se encuentra determinada por las propiedades fisicoquímicas del contaminante, principalmente por su solubilidad o su capacidad de retención. Compuestos fuertemente adsorbidos, en suelos y sedimentos, no estarán al alcance de los seres vivos, lo que reduce su potencial toxicidad.

Una baja biodisponibilidad constituye una de las principales limitaciones de la recuperación de suelos y sedimentos contaminados por COPs dado que la biodegradación de estos contaminantes sería más lenta, dando así lugar a la persistencia de estos compuestos. Por otro lado, debido a que una baja biodisponibilidad reduce la toxicidad de estos compuestos, es que se recurre a la disminución de la biodisponibilidad como método para remediar el suelo contaminado.

En general los factores que pueden estar relacionados con la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos son:

a) Adsorción – Desorción: las superficies de los suelos más activas en términos de adsorción son los minerales de arcillas, óxidos y la materia orgánica. Las arcillas generalmente poseen carga externa negativa y gran superficie específica, son capaces de adsorber principalmente cationes. Los compuestos orgánicos cargados positivamente pueden ser adsorbidos fuertemente tanto por las superficies internas como externas de las arcillas. La fracción orgánica de los suelos es también responsable de la adsorción de muchos compuestos, particularmente de aquellos que son hidrófobos. Cabe hacer notar, que cuando en la adsorción, la unión del compuesto con la fase sólida es fuerte, se podría decir que el proceso de adsorción inhibiría la biodegradación del compuesto, debido a que éstos podrían penetrar al interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo, lo cual haría más difícil su biodisponibilidad.

b) Coeficiente de reparto octanol/agua (K_{OW}): se define como la concentración del compuesto en n-octanol dividido por la correspondiente concentración en agua (se considera que el n-octanol reproduce con bastante fidelidad las propiedades adsorbentes de la materia orgánica). Con este coeficiente se puede definir la hidrofobicidad de un compuesto. La adsorción está relacionada con el K_{OW} de tal forma que, compuestos de moléculas pequeñas y polares presentan un K_{OW} bajo y tienen poca tendencia a adsorberse en los suelos, en cambio compuestos con moléculas grandes y poco polares o apolares que presentan un K_{OW} elevado tienden a adsorberse en los suelos.[14-17]

1.8 - Desarrollo de métodos analíticos

El desarrollo de métodos analíticos para la medición de la concentración de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales, es un objetivo de la química analítica. Desde este punto de vista, es posible distinguir dos estrategias de preparación de muestras, las cuales pueden ser aplicadas dependiendo del nivel de información que se necesite para resolver el problema analítico

- ❖ Extracción total
- ❖ Extracción de la fracción biodisponible

Extracción Total: en este tipo de extracción es obligatorio aplicar metodologías que permitan romper todas las interacciones existentes entre el analito de interés y la matriz para obtener así una transferencia cuantitativa de los analitos de interés hacia la fase extractante. Mediante esta técnica se obtiene información necesaria para estudios regulatorios o para la evaluación de riesgos tomando en cuenta la situación de peor escenario.

Extracción de la fracción biodisponible: Corresponde a la cantidad de analito que afecta directamente al medio ambiente o a la biota. La fracción biodisponible se define [18] como la fracción que se libera fácilmente quedando accesible para los organismos bentónicos o para su degradación. La biodisponibilidad se asocia generalmente con los procedimientos diseñados para imitar la desorción rápida de las fracciones contaminantes que están levemente enlazadas a la matriz.

1.9 - Extracción total desde matrices acuosas.

En este ámbito, clásicamente la extracción líquido-líquido (LLE) ha sido ampliamente usada para la extracción de contaminantes orgánicos desde matrices acuosas, siendo ésta una técnica versátil y relativamente eficiente, sin embargo el uso de LLE conlleva la utilización de grandes volúmenes de solventes orgánicos, además de etapas de limpieza y concentración para aumentar los límites de detección. Por estas razones actualmente la LLE se considera como una técnica contaminante, lenta y tediosa. [19]

Para superar los inconvenientes mencionados anteriormente, es que las nuevas metodologías se han centrado en la reducción en el uso de solventes orgánicos, además de mejorar la etapa de preconcentración de los analitos evitando así etapas posteriores de evaporación y limpieza (“clean up”).

En este ámbito se han descrito varias técnicas de microextracción, como por ejemplo:

- ❖ LLE en vial: Este tipo de extracción líquido-líquido se realiza en un frasco muestreador automático, seguido por centrifugación para la separación de las fases y posterior inyección de un volumen del extracto. [20- 23]
- ❖ Microextracción en una sola gota: la fase de preconcentración es una micro-gota de un disolvente orgánico inmiscible en agua, suspendida sobre una solución acuosa que contiene los analitos de interés. [24]
- ❖ Microextracción por membrana: las técnicas basada en membranas se pueden dividir en dos categorías: técnicas de membrana porosa, donde ambas soluciones están en contacto físico mediante los poros de una membrana; y las técnicas de membranas no porosas, donde la membrana forma una fase separada entre las soluciones. [25]

Actualmente, se han desarrollado nuevas estrategias de preparación de muestras que no utilizan solventes orgánicos para la extracción de los analitos, éstas se basan en el uso de sorbentes adecuados para la extracción/preconcentración de los analitos. Dependiendo de las características tanto del sorbente como del analito, la extracción puede ser controlada por diversos tipos de interacciones de los tipos químico, físico, iónico, de partición del analito entre la muestra y el sorbente o por combinación de los mecanismos mencionados anteriormente.

La desorción de los analitos, se puede realizar mediante el uso de pequeñas cantidades de solvente orgánico, este tipo se conoce como desorción líquida, o térmicamente en un inyector de un cromatógrafo de gases, conocida como desorción térmica, siendo esta última, sólo útil para la determinación de compuestos termoestables. Se ha establecido que la desorción líquida o con uso de solvente es más eficaz que la desorción térmica, ya que esta última sólo puede romper las interacciones del tipo Van der Waals. [24]

Los sorbentes que son frecuentemente usados para analitos orgánicos de baja polaridad son co-polímeros de divinilbenceno-estireno y Polidimetilsiloxano (PDMS), recientemente se ha mostrado que los nanotubos de carbono poseen una buena capacidad de sorción para la extracción de residuos múltiples. [25]

La microextracción en fase sólida (SPME), técnica que comenzó a desarrollarse durante el año 1989 [26] y que hoy en día es una de las técnicas consolidadas a nivel mundial, presenta una gran ventaja, es una técnica libre de solventes orgánicos, aunque en determinadas aplicaciones en HPLC se usa desorción en línea con solvente.

La microextracción en fase sólida permite la preconcentración de los analitos mediante la exposición de una fibra de sílice fundida recubierta con una película de PDMS u otro sorbente apropiado, directamente en la muestra (o en el espacio de cabeza) por un tiempo determinado. Luego la desorción del analito, se realiza mediante desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, el cual es usado en el posterior análisis de la muestra.

Dependiendo de las características del analito, se han descrito diversos sorbentes para su uso en SPME como:

- ❖ Polidimetilsiloxano (PDMS): analitos de baja polaridad
- ❖ Polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB): analitos semi-polares
- ❖ Poliacrilato (PA): analitos polares

La evolución de SPME en el último tiempo ha sido notable, para mejorar la capacidad de esta técnica se han propuestos diferentes polímeros y de espesor variable. [27]

Se ha descrito uno de los inconvenientes de SPME y es la pequeña cantidad de recubrimiento que se usa. Para mejorar el problema y así su eficiencia se ha propuesto aumentar el volumen de PDMS, describiéndose nuevas técnicas como:

- ❖ Extracción por sorción en barra de agitación (SBSE). [28]
- ❖ Extracción por barra de silicona (SRE). [29]
- ❖ Microextracción en una fina película de PDMS. [30, 31]

En SBSE, se recubre una barra de agitación de vidrio con una capa de 50-300 μL de PDMS, favoreciendo con esto el equilibrio de partición PDMS-agua, y alcanzando al menos una sensibilidad 100 veces mayor que SPME. Esta técnica permite la extracción cuantitativa de analitos con $\log K_{OW} > 3$ [32] como se puede observar en la Figura 2.

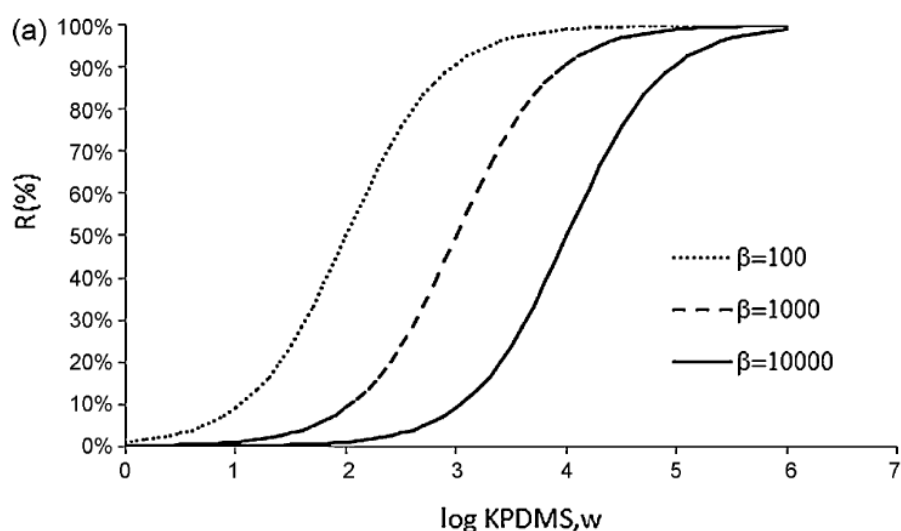


Figura 2: Recuperaciones teóricas versus $\text{Log}K_{\text{PDMS},w}$ a diversas razones de volumen agua sobre PDMS (β).

En el último tiempo se han descrito una serie de aplicaciones para SBSE que incluyen pesticidas en agua y alimento [33, 34], alquilfenoles [35, 36], hidrocarburos aromáticos policíclicos [37] entre otras. Un problema asociado a esta técnica de sorción es que el aumento de la velocidad de agitación puede causar daño físico en la fase debido al contacto directo de la barra con el fondo del vial de extracción [34]. Por otra parte, la barra tiene que ser manipulada entre el procedimiento de sorción y de desorción.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo desarrolló una nueva técnica para la extracción de contaminantes de baja polaridad, el cual consiste en un disco de teflón recubierto con una película de PDMS en una de sus superficies [38, 39] como se muestra en las Figuras 3 y 4. Esta técnica es llamada “extracción por sorción en disco rotatorio” (RDSE).

Entre las ventajas de esta nueva técnica, se podría decir que, presenta una mayor razón superficie/volumen, y una mayor velocidad de agitación con respecto a la barra utilizada en SBSE, sin dañar la fase, ya que sólo está en contacto con la muestra y no con el fondo del vial. Por lo tanto, una mayor velocidad de agitación facilita la transferencia de masa de analito desde el seno de la solución hacia la superficie de PDMS.

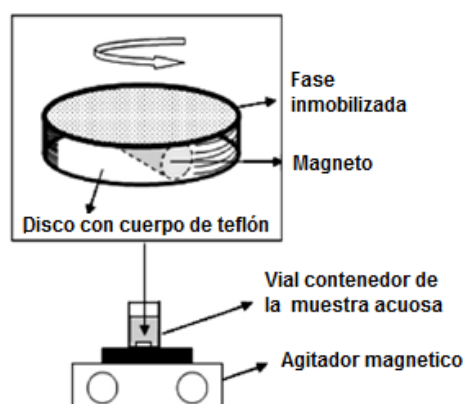


Figura 3. Dispositivo utilizado en RDSE.



Figura 4. Imágenes del sistema, vial y disco usado en RDSE.

Algunos aspectos teóricos de la capacidad de sorción de PDMS se describen a continuación:

De acuerdo con la siguiente ecuación, descrita previamente para SPME [26]:

$$\text{Recuperación} = \frac{K_{ow}}{\beta / (1 + \frac{K_{ow}}{\beta})} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde β corresponde a la relación de volumen entre el agua y la fase de PDMS, los compuestos con baja polaridad ($\text{Log } K_{ow} > 3$) deberían ser extraídos cuantitativamente en PDMS a partir de muestras acuosas. Observaciones anteriores con respecto a la partición entre PDMS y agua sugieren que la transferencia de masa de compuestos orgánicos de baja polaridad no es solo limitada por la difusión interna en el PDMS, sino que también por la difusión en la capa de agua estacionaria que se forma sobre el disco [40 - 42].

En este contexto, la velocidad de agitación es uno de los factores importantes para una extracción eficiente en RDSE. A una mayor velocidad de agitación (flujo turbulento) el espesor de la capa estacionaria de agua disminuye, lo que facilita el transporte de masas desde el seno de la solución hacia la fase de extracción. [39]

Así el efecto de la disminución de la capa estacionaria y su relación con el tiempo de equilibrio (t_e) entre los analitos de la muestra y la fase de PDMS puede ser teóricamente entendida mediante la siguiente ecuación, previamente descrita para PDMS [30, 31]:

$$t_e = \frac{3 \cdot \delta \cdot K_d \cdot P_t}{D} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde δ es el espesor de la capa estacionaria; D es el coeficiente de difusión de la solución; " t " el tiempo de equilibrio; K_d el coeficiente de distribución del analito entre la fase de PDMS y la solución y P_t es el espesor de la fase de PDMS, como se puede ver en la Figura 5. En consecuencia, mediante el aumento de la velocidad de rotación, se reduce la capa de agua estacionaria facilitando la extracción y por consiguiente el tiempo de equilibrio disminuye.

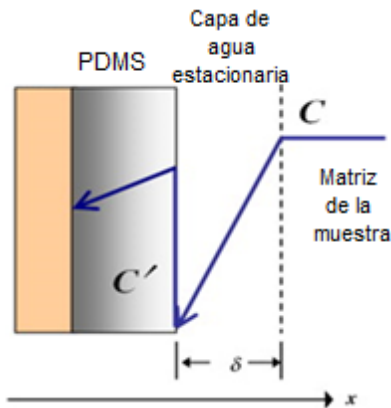


Figura 5: Diagrama de la capa estacionaria de agua que se forma sobre el PDMS.

1.10 - Extracción de la fracción biodisponible de PCBs en suspensión acuosa de suelo

Es sabido que las interacciones analito-matriz varían dependiendo de la naturaleza fisicoquímica de cada uno de ellos. En los suelos se ha demostrado que gran cantidad de los contaminantes orgánicos pueden quedar atrapados en la materia orgánica y en menor medida en los componentes minerales del suelo disminuyendo así su extractabilidad. [40]

En literatura se han descrito variados procedimientos de extracción secuencial los que permiten asociar la fracción extraíble del analito con la interacción entre éste y los

diferentes sitios activos de la matriz. En el ámbito de los contaminantes orgánicos, se reconocen por lo menos 3 fracciones: la fracción disponible, una fracción que se desorbe en periodos de tiempo más largos y una fracción que se encuentra fuertemente enlazados a la matriz y que se desorbe en períodos de meses, años, siglos y hasta milenios [41]. De esta manera, no se aplica sobre la cinética de desorción una única constante de velocidad, pero si se pueden observar cinéticas de dos y tres tipos [42, 43] lo que permite discriminar las fracciones de desorción rápida, lenta y muy lenta.

Hoy en día, la medición de la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales no es tomada en cuenta para estudios de evaluación de riesgos y los sitios contaminados son evaluados en base a la concentración total de los contaminantes [44, 45]. Sin embargo es conocido que una pequeña fracción del total de los contaminantes que existen en el suelo, es biodisponible, y es la que podría producir efectos de toxicidad en la biota.

Por definición, la biodisponibilidad de compuestos químicos en el suelo, sólo se puede estimar evaluando la absorción de estos compuestos por organismos vivos. De acuerdo a la definición de biodisponibilidad dada por Semple [14], se han descrito diversas técnicas rutinarias para poder determinarla. Teniendo en cuenta que la evaluación de la biodisponibilidad mediante sistemas biológicos requiere de mucho tiempo, es esencial estimar de forma rápida la fracción biodisponible para elaborar directrices sobre la calidad del suelo.

En este contexto, se han propuesto usar distintos enfoques para evaluar o simular la biodisponibilidad [46] incluyendo:

- Extracción con solvente suave en diferentes medios utilizando n-hexano y una mezcla n-hexano y acetona [47], butanol [48], otros solventes orgánicos o sus mezclas con agua [49], dióxido de carbono supercrítico [50], agua sub-crítica [51], extracción con solvente acelerada (ASE) [52, 53]. La biodisponibilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en la absorción radicular puede ser imitada mediante la extracción ASE solo con agua o con n-hexano [52]. En un experimento similar usando un suelo enriquecido con sustancias húmicas, se constató que la fracción extraíble de DDT en n-hexano es un buen indicador de la biodisponibilidad de estos compuestos en las raíces de la plantas. [53]

- Extracción con fluidos biomiméticos [54]. En este caso, usando incubaciones con fluidos intestinales extraídos de la *Arenicola marina*, se estimó la biodisponibilidad de los PAHs en cenizas, polvo de carbón, hollín, partículas urbanas entre otras. Se observó que estos fluidos solubilizan una concentración significativa de los PAHs desde algunos de los materiales nombrados anteriormente.
- Desorción en agua con posterior sorción en un sorbente, por ejemplo discos de membrana de C18 [55, 56], TENAX [57], XAD2 [58] o PDMS [44, 59, 60].

Se pueden usar métodos basados en equilibrios de partición para determinar la concentración libre disuelta o como dispositivos para determinar la acumulación en los organismos. Según Van del Wall et al [44] el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en los métodos basados en la partición, depende en gran medida de la relación superficie-volumen del dispositivo. Las membranas semipermeables son lentas, mientras que los dispositivos recubiertos con polímeros son más rápidos debido a su mayor superficie-volumen. Otro factor crítico en los métodos basados en la partición es la cantidad de fase hidrofóbica usada en los dispositivos. Un gran volumen de fase, puede reducir la concentración real del suelo debido a los flujos de contaminantes que van hacia el dispositivo. En consecuencia, si para la extracción de los contaminantes se introduce una pequeña cantidad de la fase en las muestras de suelo o sedimento la concentración no se ve afectada [60]. En el estudio mediante fibras de Van del Wall et al. [44] se consideró la captación y acumulación de tres clorobencenos en la biota (*Enchytraeus crypticus*) y 30 μm de fibra recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS) después de la exposición a los suelos con diferentes concentraciones de los contaminantes. La sorción de los tres clorobencenos mediante *Enchytraeus cypticus* fue rápida alcanzando su nivel máximo entre los 2 – 4 días, en cambio la sorción en las fibras recubiertas con PDMS, para los tres compuestos, fue muy rápida, los niveles alcanzados después de un día, mostró buenas correlaciones para la sorción de los compuestos por estos dos métodos.

Del mismo modo, se realizó un estudio para la determinación de la biodisponibilidad, de DDT, DDE y DDD en suelos mediante el uso de lombrices [55]. Se hicieron mediciones de la absorción a través de *Eisenia foetida* de los tres pesticidas en siete suelos en los que los contaminantes habían persistido durante un máximo de 49 años, las lombrices asimilaron desde un 3,15 – 66,2 % de los compuestos. Diferentes cantidades de los

compuestos fueron sorbidas por discos de C-18 colocados en suspensiones de estos suelos en agua. Las cantidades sorbidas de los compuestos mediante los discos de C18 en un día mostró una buena correlación con respecto a la absorción mediante *Eisenia foetida* en las muestras de suelo. Esto demuestra que la determinación de la concentración de los contaminantes orgánicos persistentes en una fase hidrofóbica de PDMS se puede utilizar como una herramienta sencilla para determinar la concentración de estos compuestos químicos en los seres vivos expuestos a las matrices complejas, tales como suelo o sedimento.

En esta perspectiva y de acuerdo con lo expuesto previamente sobre las ventajas de la configuración del disco rotatorio con fase de PDMS para llegar rápidamente al equilibrio, se propone el uso de extracción por sorción mediante disco rotatorio (RDSE) con el fin de evaluar o imitar la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) del tipo bifenilos policlorados (PCBs) en suelos agrícolas que son susceptibles a contaminación. Se estudiará el efecto de la aplicación de biosólidos sobre el suelo, considerando que la incorporación de materia orgánica disminuye la biodisponibilidad de ciertos compuestos orgánicos. La principal ventaja de esta aplicación sería la respuesta rápida del disco que contiene PDMS u otras fases sorbentes (C18, nanotubos de carbono) tanto por su elevada velocidad de agitación y su alta relación superficie-volumen. El rendimiento de este sistema será comparado con bioensayos en plantas de trigo [39]. La metodología biomimética propuesta en este estudio se basará en un previa lixiviación del suelo en estudio con solución 0,001 M de CaCl_2 , de acuerdo al método estándar ISO/TS21268-1 [61], y en seguida los PCBs lixiviados en el agua serán extraídos mediante RDSE, de acuerdo al método optimizado en la primera parte de la tesis.

De acuerdo a todo lo planteado se estudiará un método cuantitativo para la determinación de PCBs desde matrices acuosas, involucrando la extracción/preconcentración en un dispositivo de disco rotatorio con diversas fases entre las que se encuentran PDMS, C18, MWCNT y PMVQ (fase usada en SRE pero inmovilizada sobre un disco rotatorio). Se aplicará este sistema a la estimación de la fracción biodisponible de los contaminantes en muestras de suelo.

Capítulo II

Hipótesis

Objetivos

II. Hipótesis

Los PCBs podrían ser extraídos y preconcentrados desde matrices acuosas a través de un dispositivo de disco rotatorio (RDSE) con diversas fases sorbentes apolares inmovilizadas en su superficie, produciéndose la extracción más rápida en la fase que presente una mayor área superficial efectiva.

La extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) en conjunto con un proceso previo de lixiviación en agua podría utilizarse como metodología biosimuladora para estimar la biodisponibilidad de PCBs en muestras de suelo

III. Objetivos

3.1 - Objetivos generales

- Desarrollar un método analítico para determinar la concentración total de PCBs en muestras acuosas mediante el uso de RDSE para la extracción y la posterior cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada con detector de masas.
- Desarrollar un método para evaluar la biodisponibilidad de PCBs mediante extracción con RDSE en extractos acuosos de suelos y la posterior cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas.

3.2 - Objetivos específicos

- Optimizar un programa cromatográfico por GC para los analitos en estudio.
- Optimizar las variables que afectan a la determinación de PCBs en muestras acuosas mediante RDSE recubiertos con distintas fases de extracción (PDMS, octadecil C18, nanotubos de carbono y PMVQ.
- Determinar las propiedades analíticas del método analítico.
- Aplicación de RDSE en muestras acuosas reales.
- Realizar un estudio de biodisponibilidad de PCBs mediante el uso de plantas de trigo.
- Optimizar las variables que afecten la determinación de biodisponibilidad mediante el uso de RDSE.
- Implementar un método de extracción de PCBs desde tejido vegetal de las plantas.
- Aplicación de esta nueva técnica en muestras de suelos y suelos enmendados con diversas dosis de biosólidos para la determinación de biodisponibilidad de PCBs y estudiar el efecto de la materia orgánica.
- Comparación de los datos obtenidos entre la determinación de biodisponibilidad mediante el estudio con plantas y el estudio mediante disco rotatorio.
- Análisis estadístico de los datos.

Capítulo III

Materiales y

Métodos

IV. Materiales y métodos

4.1 - Reactivos

- PCB 77, PCB 81, PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 126, PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169, PCB 189 (AccuStandar), todos en grado analítico con 99% de pureza.
- Polidimetilsiloxano Sylgard® 184 silicone elastomer kit.
- Discos C18 extracción en fase solida, Empore TM Octadecyl C18, 47 mm.
- S-Purified Multiwall Nanotube, OD 60-100 nm, SES Research.
- Elastómero de silicona (MQ/VNQ/PMQ/PVMQ) vara de 2,0 mm de diámetro, Goodfellow Cambridge Limited Inglaterra (Silicone rod).
- Metanol LiChrosolv (Merck).
- n-Hexano SupraSolv (Merck).
- Diclorometano LiChrosolv (Merck).
- Acetona LiChrosolv (Merck).
- Cloruro de sodio (NaCl) p.a. EMSURE® (Merck).
- Cloruro de calcio di hidratado P.A. (Merck).
- Acido sulfúrico 95 – 97 % p.a. EMSURE® (Merck).
- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) p.a. EMSURE® (Merck).
- Nitrógeno extra puro (Linde).
- Agua MilliQ.

4.2 - Materiales

- Discos de teflón de 15 mm de diámetro.
 - Viales de 2 mL, 12 mL, 24 mL, 40 mL y 60 mL.
 - Jeringas de 10 µL, 100 µL, y 1000 µL Hamilton.
 - Probetas de 10 mL, 50 mL y 100 mL.
 - Matraces aforados de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 100 mL, y 500 mL.
 - Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL, 5 mL, 8 mL y 10 mL.
 - Pipetas pasteur.
 - Tubos centrifuga 50 mL Pyrex.
 - Tubos de centrifuga de 10 mL cónicos Pyrex.
 - Balón de fondo redondo de 1000 mL.
-

- Macetas de polipropileno para estudio de biodisponibilidad.
- Arena de Cuarzo.
- Silicona.
- Columnas de vidrio para manifold.
- Lana de vidrio.

4.3 - Equipos

- Agitador magnético Heidolph MR 3002.
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II.
- Cromatógrafo de gases Thermo Scientific Focus GC.
- Detector de masa Thermo Scientific ISQ.
- Sonicador Transsonic T310.
- Baño ultrasonido Power Sonic 410.
- Balanza analítica Precisa 125 A.
- Balanza electrónica Precisa Junior 500C.
- Analog Heatblock VWR.
- Rotavapor Heidolph Laborota 4001 efficient.
- pH metro Microprocesor pH/Ion PMX 3000.
- Agitador Heidolph Promax 2020.
- Centrífuga Varifugue 3.0 Heraeus.
- Incubadora VWR.
- Manifold Supelco.

V. Métodos**5.1 - Procedimiento de extracción y elución**

Se usaron diversas fases de extracción, como polidimetilsiloxano (PDMS), octadecil C18 y nanotubos de carbono de multipared (MWCNT), todas inmovilizadas en la superficie de un disco rotatorio de teflón de 15 mm de diámetro. Entre las variables estudiadas se encuentran:

- a) Cantidad de cloruro de sodio (NaCl) (“salting-out”).
- b) Cantidad de metanol (MeOH).
- c) Tiempo de agitación.
- d) Volumen de muestra.

Comparativamente se hicieron estudios con varas de silicona (Silicon rod) de 20 mm de largo x 2,0 mm diámetro, también inmovilizadas sobre disco rotatorio.

5.2 - Estudio de la adición de NaCl y MeOH

Para estudiar el efecto simultáneo de estas dos variables, se realizó un diseño experimental del tipo “Diseño Compuesto Central” centrado en las caras con tres puntos centrales ($2^k + 2K + C$) con las siguientes condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones experimentales del “Diseño de Compuesto Central” usado en la optimización de las variables %NaCl y %MeOH.

Variables	Niveles		
	-1	0	1
% NaCl	0	10	20
% MeOH	0	10	20

Obteniéndose una serie de 11 experimentos, los cuales se muestran a continuación, en la Tabla 4, con los valores codificados y entre paréntesis los valores naturales

Tabla 4: Condiciones experimentales codificadas y naturales de las variables %NaCl y %MeOH estudiadas para la extracción de los PCBs en estudio desde matrices acuosas.

Nº experimentos	Variables a estudiar	
	% NaCl	% MeOH
1	-1 (0)	-1 (0)
2	1 (20)	-1 (0)
3	-1 (0)	1 (20)
4	1 (20)	1 (20)
5	-1 (0)	-1 (0)
6	1 (20)	-1 (0)
7	-1 (0)	1 (20)
8	1 (20)	1 (20)
9	0 (10)	0 (10)
10	0 (10)	0 (10)
11	0 (10)	0 (10)

Para este estudio se mantuvo constante, el tiempo de agitación de 180 minutos, el volumen de muestra de 50 mL, la velocidad de rotación a 1250 rpm y la concentración a 1,5 ng·mL⁻¹.

5.3 - Estudio del tiempo de agitación

El estudio de esta variable se realizó a distintos períodos de tiempo entre 10 – 1440 minutos (24 horas) a una velocidad de rotación constante de 1250 rpm, un volumen de muestra de 50 mL, con un 20% metanol y a una concentración de PCBs de 1,5 ng·mL⁻¹.

5.4 - Estudio del Volumen de muestra

Esta variable se estudió entre 10 y 50 mL, en las condiciones óptimas encontradas para las otras variables.

5.5 - Determinación mediante GC-ECD

La determinación de los analitos (PCBs) desde los extractos se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de captura de electrones (GC-ECD) en las siguientes condiciones:

- Columna capilar HP-5 (30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 μm tamaño de film).
- Temperatura del inyector: 250°C.
- Temperatura del detector: 250°C.
- Modalidad: Splitless.
- Presión de Inyector: 15 psi.
- Volumen de inyección: 1 μL .

Programa térmico del horno: Temperatura inicial: 100°C, seguido de una rampa de 8°C/min hasta llegar a una temperatura final de 260°C, quedándose en esta temperatura por 3 minutos, obteniéndose un tiempo total de corrida cromatográfica de 25 minutos.

5.6 - Determinación mediante GC-MS

Se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas para corroborar si el orden de las señales obtenidas mediante GC-ECD corresponden a los PCBs en estudio, para ello se utilizaron las siguientes condiciones:

- Columna capilar Rxi[®]-5Sil MS (30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 μm tamaño de film).
- Temperatura del inyector: 240°C.
- Temperatura del detector: 300°C.
- Modalidad: Splitless.
- Gas transportador: Helio.
- Flujo Helio: 1,2 mL·min⁻¹.
- Volumen inyección: 1 μL .

Programa térmico del horno: Temperatura inicial: 100 °C, seguido de una rampa de 6 °C·min⁻¹ hasta llegar a una temperatura final de 280 °C, quedándose en esta temperatura por 1 minuto, obteniéndose un tiempo total de corrida cromatográfica de 31 minutos.

Tanto para los analitos como para el estándar interno, fueron monitoreados dos iones, los cuales se muestran en la Tabla 5. El ion de cuantificación, es el que registra mayor

intensidad en el cromatograma, seguido del ion de confirmación, ambos iones permiten identificar a cada uno de los PCBs, tanto en la muestra como en los estándares.

Tabla 5: Iones de cuantificación y confirmación para los distintos PCBs en estudio y para el estándar interno (HCB)

Iones (m/Z)	PCBs											HCB
	77	81	105	114	118/123	126	156	157	167	169	189	
Cuantificación	290	290	326	326	326	326	360	360	360	360	394	282
Confirmación	292	292	328	328	328	328	362	362	362	362	396	284

5.7 - Límites de detección y cuantificación.

Se estimaron los límites de detección y cuantificación, a través de la relación señal-ruido existente en un cromatograma de los analitos, registrados a una concentración de 1 µg·L⁻¹ de los PCBs en estudio.

Mediante las ecuaciones 3 y 4 se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

$$LD = 3,3 \cdot \frac{A_{Ruido}}{A_{Señal}} \cdot C_{std} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$LC = 10 \cdot \frac{A_{Ruido}}{A_{Señal}} \cdot C_{std} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

A_{Ruido}: Área del ruido en el cromatograma.

A_{Señal}: Área del analito en el cromatograma.

C_{std}: concentración del estándar (µg·L⁻¹).

5.8 - Estudio de biodisponibilidad

Para determinar la biodisponibilidad de los distintos PCBs se seleccionó un suelo agrícola y un biosólido, ambos de la Región Metropolitana, además se seleccionó trigo para el estudio de biodisponibilidad. Esta planta es cultivada en ambos hemisferios y ampliamente usada para la obtención de harina destinada a la elaboración de pan y otros productos alimenticios.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Poales
Familia: Poaceae, Pooideae
Tribu: Triticeae
Género: Triticum
Especie: T. aestivum



Figura 6: Clasificación de la planta de trigo usada en el estudio de biodisponibilidad.

5.9 - Muestras de suelo

La muestra se obtuvo del nivel superficial (0 – 20 cm) de un suelo agrícola de la Región Metropolitana de la serie Taqueral, correspondiente al orden “Mollisol”, el cual presenta una textura franco-limosa. El suelo se almacenó en bolsas de polipropileno para su transporte al laboratorio donde fue secado al aire, disgregado y tamizado a 2 mm para su posterior almacenamiento a temperatura ambiente hasta su uso.

5.10 - Muestra de biosólido

Se utilizó un lodo estabilizado anaeróbicamente proveniente de un monorelleno de una de las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas de la Región Metropolitana, cuyo muestreo se realizó durante mayo del 2008, el cual fue identificado como BET2008.

5.11 - Caracterización de suelos y biosólidos.

El suelo fue caracterizado mediante la determinación de pH, cantidad de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico y textura, mientras que el biosólido solo se le determinó el pH y del contenido de carbono orgánico.

5.11.1 - Determinación de pH.

La determinación de pH, tanto del suelo como del biosólido, se realizó potenciométricamente mediante el uso un electrodo combinado vidrio-calomelano, en el sobrenadante de una suspensión de 10 g de suelo y 25 mL de agua, el cual se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar durante 2 horas. [62]

5.11.2 - Determinación de carbono orgánico.

El contenido de carbono orgánico se determinó por combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en medio H_2SO_4 . Después de la reacción, se

cuantifica colorimétricamente el Cr^{3+} formado, en un espectrofotómetro UV-Visible Unicam UV-2, con celda de plástico de 1 cm de paso óptico, a una longitud de onda de 600 nm. [62].

5.11.3 - Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico.

La determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) se realizó por saturación con acetato de sodio a pH 7, el sodio adsorbido se intercambió por amonio. Posteriormente el sodio liberado se determinó por espectroscopia de emisión atómica. [62]

5.12 - Ensayo de invernadero

Para el estudio con plantas se usaron macetas de polipropileno las cuales se forraron en su interior con papel aluminio, al fondo se colocó malla y cuarzo para evitar la pérdida de muestra. Posteriormente a cada maceta se agregó una mezcla de suelo-biosólido natural y enriquecido con PCBs, en las dosis de $0 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, $30 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, $90 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ y $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, en triplicado, obteniendo un total de 24 macetas. La dosis $0 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ se repite en ambos tratamientos, por tanto este ensayo se realizó una sola vez, obteniéndose finalmente la cantidad de 21 macetas en total, cómo se puede observar en la Tabla 6. Luego se sembraron $7,0 \pm 0,5$ gramos de semillas de trigo (*Triticum aestivum*) en cada una de las macetas. El cultivo se mantuvo con períodos de luz de 14/10 horas (día/noche), a temperatura constante de 25 ± 5 °C. Las plantas fueron regadas diariamente sólo con agua destilada, manteniéndolas por 30 días a contar del día de siembra de las semillas.

Tabla 6: Dosis de biosólido y cantidad de macetas usadas en el estudio de biodisponibilidad.

Dosis biosólido	Biosólido sin enriquecer	Biosólido enriquecido
0	3 macetas	
30	3 macetas	3 macetas
90	3 macetas	3 macetas
200	3 macetas	3 macetas

5.13 - Preparación de las muestras de plantas.

Luego del cultivo, las plantas se cosecharon y se lavaron con agua potable para eliminar el exceso de suelo adherido a las raíces, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se secaron a 30 °C por un periodo aproximado de una semana.

A las plantas secas se les determinó su masa por separado (hojas y raíz) para la determinación de su masa seca y se molieron para facilitar su posterior análisis.

5.14 - Estudio biosimulador en mezclas suelos-biosólido.

Para determinar la biodisponibilidad de PCBs en suelos y suelos enmendados con biosólidos mediante el uso de RDSE, se realizó previamente una lixiviación de los analitos basado en el uso de la norma ISO/TS 21268-1. [61]

Para poder aplicar esta norma, se estudió la cinética de desorción de los PCBs en las muestras de suelo, por lo que se siguió el procedimiento descrito en la Figura 7, en el cual en un tubo de centrífuga de vidrio, se colocaron 5 g. de suelo junto a 10 mL. de una solución 0,01 M de CaCl_2 al 10% en metanol, éste se agregó para evitar que los PCBs liberados en el proceso de lixiviación, se absorban en las paredes del vial de extracción. Se agitó durante distintos periodos de tiempo (5 a 4320 minutos), luego se centrifugó por 15 minutos a 2500 rpm descartándose el sólido y determinándose la presencia de PCBs en el sobrenadante por medio de RDSE.

La elección de CaCl_2 como agente extractante se basó en diversas consideraciones que describió Houba [63] dentro de las cuales la más relevante para este caso es que esta solución tiene fuerza iónica promedio similar a las disoluciones de suelo (0,03 M).

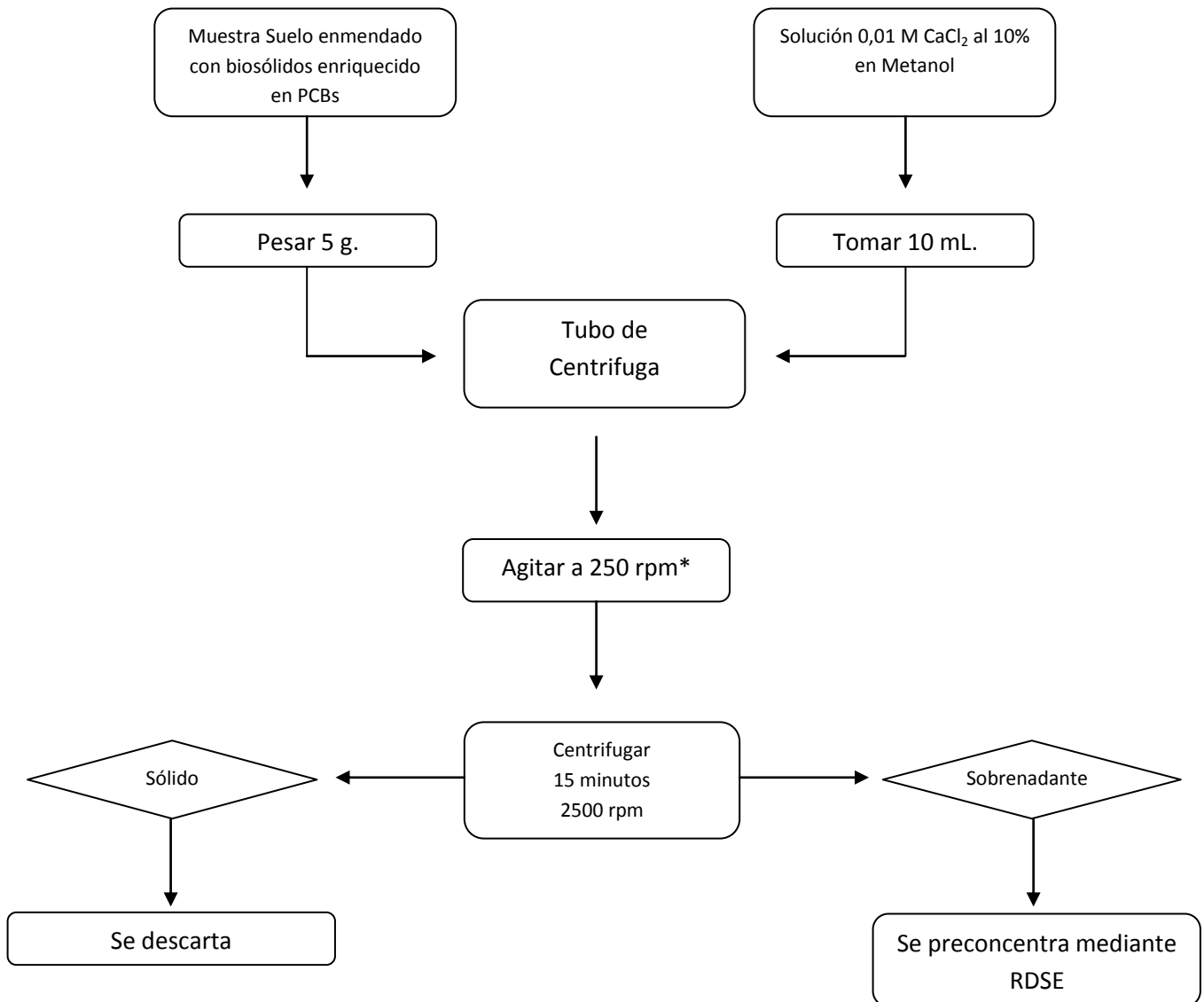


Figura 7: Diagrama de la metodología biosimuladora mediante un método de lixiviación basado en la norma ISO/TS 21268-1 y su posterior etapa de sorción en RDSE.

*la agitación se estudió entre 5 y 4320 minutos.

5.15 - Extracción de PCBs desde plantas (raíces y hojas).

La extracción de PCBs desde hojas y raíces de plantas de trigo se realizó a través de extracción asistida con ultrasonido, basándose en el método EPA 3635C [64] como se muestra en la Figura 8. Se pesaron 0,5 g. de muestra, se agregaron 10 mL. de una mezcla hexano/acetona : 1/1, se colocaron en un tubo de centrifuga, y se sometió a ultrasonido durante 15 minutos, luego la muestra se centrifugó por 15 minutos a 2500 rpm., donde el sobrenadante fue concentrado y almacenado para el posterior proceso de limpieza.

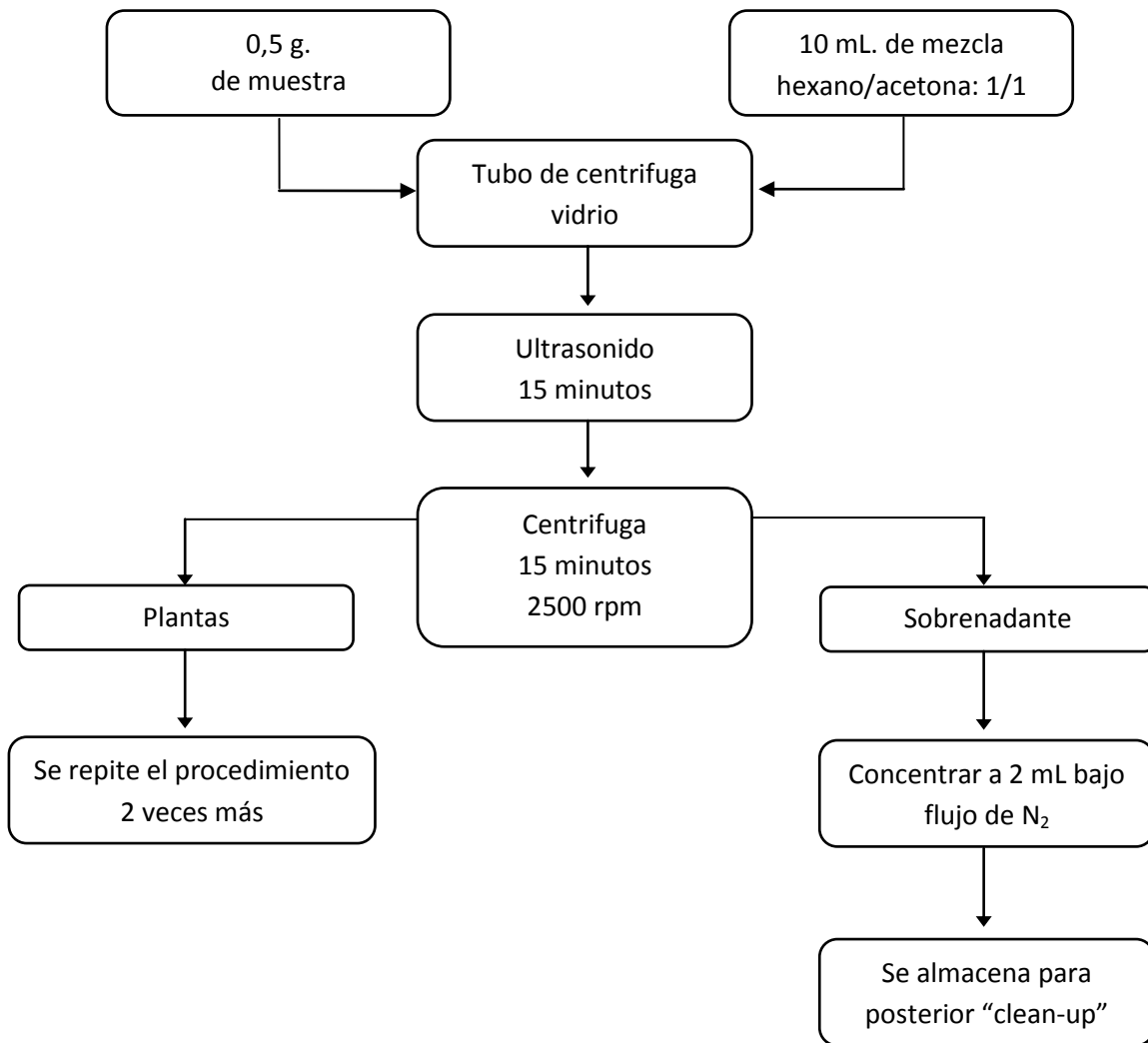


Figura 8: Diagrama del proceso de extracción de PCBs desde las muestras de plantas (hojas y raíces) de trigo basado en el método EPA 3635C.

5.16 - “Clean-Up” de extractos de plantas.

Para la limpieza de los extractos de plantas (hojas y raíz) se usó el método EPA 3665A [65], como se puede observar en la Figura 9, a 2 mL. de extracto se le adicionó 3 mL. de ácido sulfúrico concentrado, se agitó en vortex durante 90 segundos, se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm, separándose la parte orgánica (superior) de la parte acuosa ácida (inferior). La parte orgánica se almacena y la parte ácida se lava nuevamente 2 veces más con 1 mL. de hexano cada una, la nueva parte orgánica se almacena junto a la parte orgánica anterior, de ser necesario, se repite el procedimiento con H₂SO₄ concentrado, luego la parte orgánica se lavó con 5 mL. de solución de NaCl al 2%, esta solución fue usada para eliminar el exceso de ácido que pueda quedar en la parte orgánica.

Luego la parte orgánica se pasó por una columna de 10 g. de Na₂SO₄ anhidro en un equipo Manifold para eliminar el exceso de humedad existente en el extracto, finalmente se concentró a 1 mL. bajo flujo de N₂, y fue almacenado a 4 °C hasta su posterior análisis mediante cromatografía gaseosa.

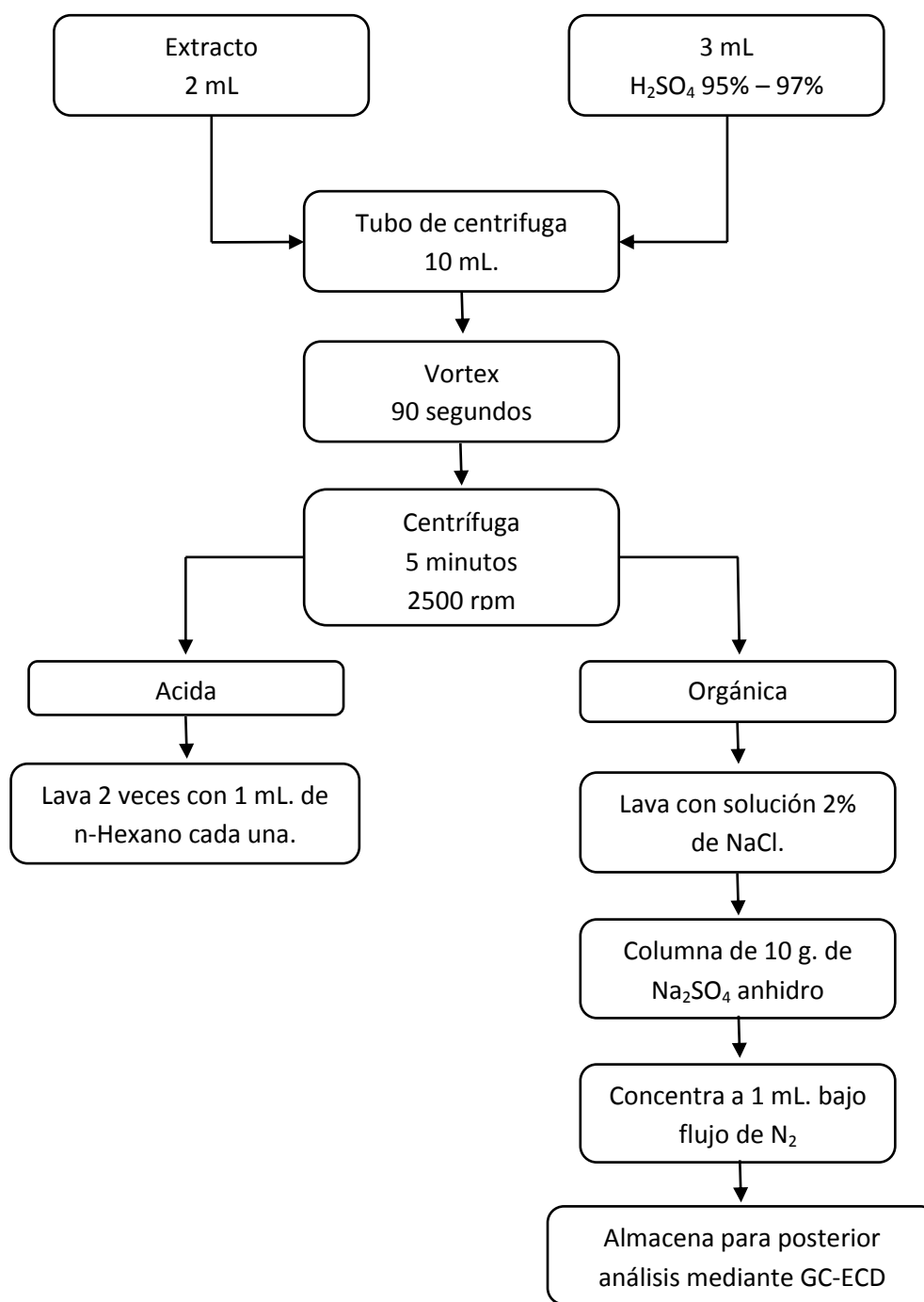


Figura 9: Diagrama del método de limpieza usado para las muestras de plantas de trigo basado en método EPA 3665A.

Capítulo IV

Resultados y Discusión

VI. Resultados y Discusión

6.1 - Selección de los analitos.

De los 209 congéneres de PCBs solo 12 de ellos presentan propiedades toxicológicas similares a las dioxinas. Por esta razón es que se decidió trabajar con los analitos que se observan en la Tabla 7, que según la Organización Mundial de la Salud (WHO) son los más peligrosos de todos los PCBs.

Tabla 7: Número y nombre IUPAC, homólogo al que pertenecen y TEF de los 12 PCBs seleccionados para el estudio en esta tesis.

# IUPAC	Grupo Homólogo	Nombre IUPAC	TEF 2005
77	TeCBp	3,3',4,4'-TeCBp	0,0001
81	TeCBp	3,4,4',5-TeCBp	0,0003
105	PCBp	2,3,3',4,4'-PCBp	0,00003
114	PCBp	2,3,4,4',5-PCBp	0,00003
118	PCBp	2,3',4,4',5-PCBp	0,00003
123	PCBp	2,3',4,4',5-PCBp	0,00003
126	PCBp	3,3',4,4',5-PCBp	0,1
156	HCBp	2,3,3',4,4',5-HCBp	0,00003
157	HCBp	2,3,3',4,4',5'-HCBp	0,00003
167	HCBp	2,3',4,4',5,5'-HCBp	0,00003
169	HCBp	3,3',4,4',5,5'-HCBp	0,03
189	HeCBp	2,3,3',4,4',5,5'-HeCBp	0,00003

Debido a la amplia variedad en la toxicidad de estos compuestos, la WHO desarrolló el concepto de equivalente tóxico (TEQ) para facilitar la evaluación de riesgo y los controles reglamentarios. Para ello se seleccionó como congénere de referencia a la dioxina más tóxica (2, 3, 7, 8 tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD)) definiéndola con factor de equivalente tóxico (TEF) igual a uno. La concentración de los congéneres en la muestra analizada es multiplicada por este valor de TEF para revelar el TEQ expresado en $\eta\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. [66, 67]

6.2 - Determinación cromatográfica de los analitos.

6.2.1 - Cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica (GC-ECD).

Se estudiaron las condiciones cromatográficas y se seleccionaron las siguientes para la separación de los 12 PCBs en estudio:

- Columna capilar HP-5 (30 m, 0,25 mm D.I., 0,25 µm tamaño de film).
- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modalidad: Splitless.
- Temperatura del detector: 300°C.
- Presión de Inyector: 15 PSI.
- Volumen de inyección 1 µL.
- Programa térmico del horno: Temperatura inicial: 100°C, seguido de una rampa de 8°C/min hasta llegar a una temperatura final de 260°C, quedándose en esta temperatura por 3 minutos, obteniéndose un tiempo total de corrida cromatográfica de 24 minutos.

La Figura 10, muestra un cromatograma de un estándar de 100 µg·L⁻¹ de los 12 PCBs en estudio en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

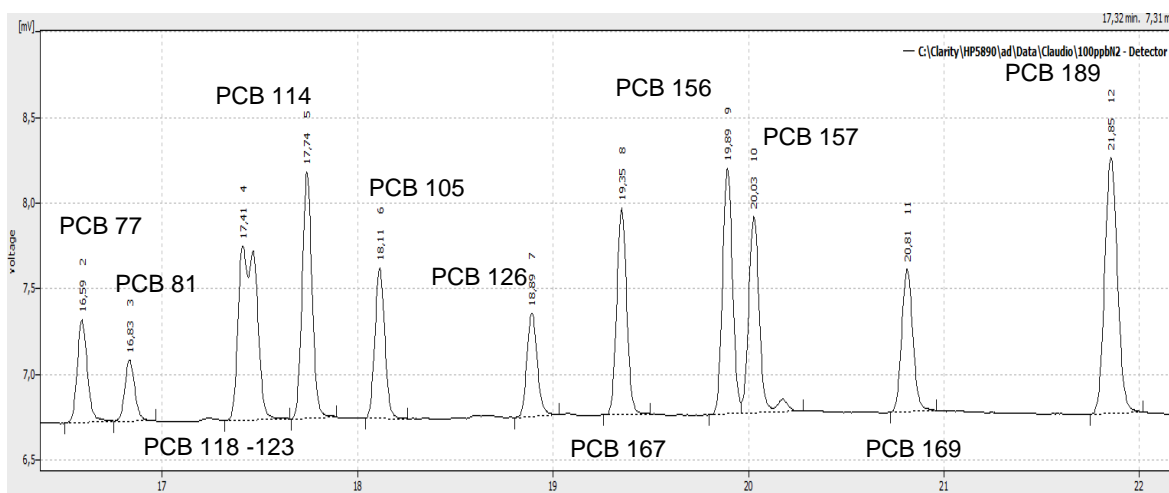


Figura 10: Cromatograma de los 12 PCBs que se han utilizado para los estudios de optimización.

Se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a detector de masa para la confirmación de las señales cromatográficas.

Uno de los problemas que se presentó durante la cromatografía, fue la co-elución de los PCBs 118 y 123, como se muestra en la Figura 10, en este caso no es posible la total separación cromatográfica de estos dos congéneres pentaclorados ya que sus tiempos de retención se encuentra muy cercanos el uno del otro, debido a que presentan características de temperatura de ebullición y polaridades similares, por lo que se optó por estimarlos de forma simultánea en una misma señal.

Para poder lograr la separación de estos dos analitos, se debería utilizar a un flujo menor, lo que incrementaría el tiempo de separación cromatográfico más allá de los 25 minutos requeridos para un flujo de 15 psi. Otra opción es utilizar una rampa de temperatura menor o bien, durante el período de tiempo en el cual eluyen los analitos, hacerla isotérmica. En ambos casos también se produciría un aumento en el tiempo final de la separación cromatográfica. Finalmente, se decidió privilegiar el tiempo de análisis y hacer una integración común para ambas señales.

6.2.2 - Cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas (GC-MS)

En la Figura 11, se muestra un cromatograma obtenido mediante GC-MS de una mezcla de estándares de PCBs en una concentración de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno. Se puede observar en la Figura 11.A, todas las señales correspondientes a los 12 PCBs, los siguientes cuatro cromatogramas de la Figura 11 (B, C, D y E), muestran los correspondientes cromatogramas cuando se extraen los iones de cuantificación para cada uno de los PCBs en estudio, así en la Figura 11.B se pueden observar dos grandes señales a los 23,32 min. y 26,78 min., que corresponden a los PCBs 77 y 81 respectivamente. En la Figura 11.C, se observan cuatro señales, a 24,34 min., 24,78 min., 25,52 min., y 26,97 min, que corresponden a los PCBs 118/123, 114, 105 y 126 respectivamente. En la figura 11.D, se destacan cuatro señales a 26,75 min., 27,43 min., 27,60 min. y 28,52 min. correspondientes a los PCBs 167, 156, 157 y 169 respectivamente, y en la Figura 11.E, se observa una sola gran señal a los 29,61 min., que corresponde al PCB 189.

En la Figura 12, se puede observar los espectros de masas tanto de los iones de cuantificación como confirmación correspondientes a cada uno de los grupos de congéneres de PCBs, observándose Figura 12.A, los iones correspondientes a los PCBs tetraclorados 77 y 81, en la Figura 12.B se puede ver el espectro de masas correspondiente al grupo de PCBs pentaclorados 105, 114, 118/123, 115 y 126, en la Figura 12.C se observa el espectro de masas correspondiente a los PCBs hexaclorados 156, 157, 167 y 169, y en la Figura 12.D, se observa el espectro de masas correspondiente al PCBs 189, el cual es un heptaclorado.

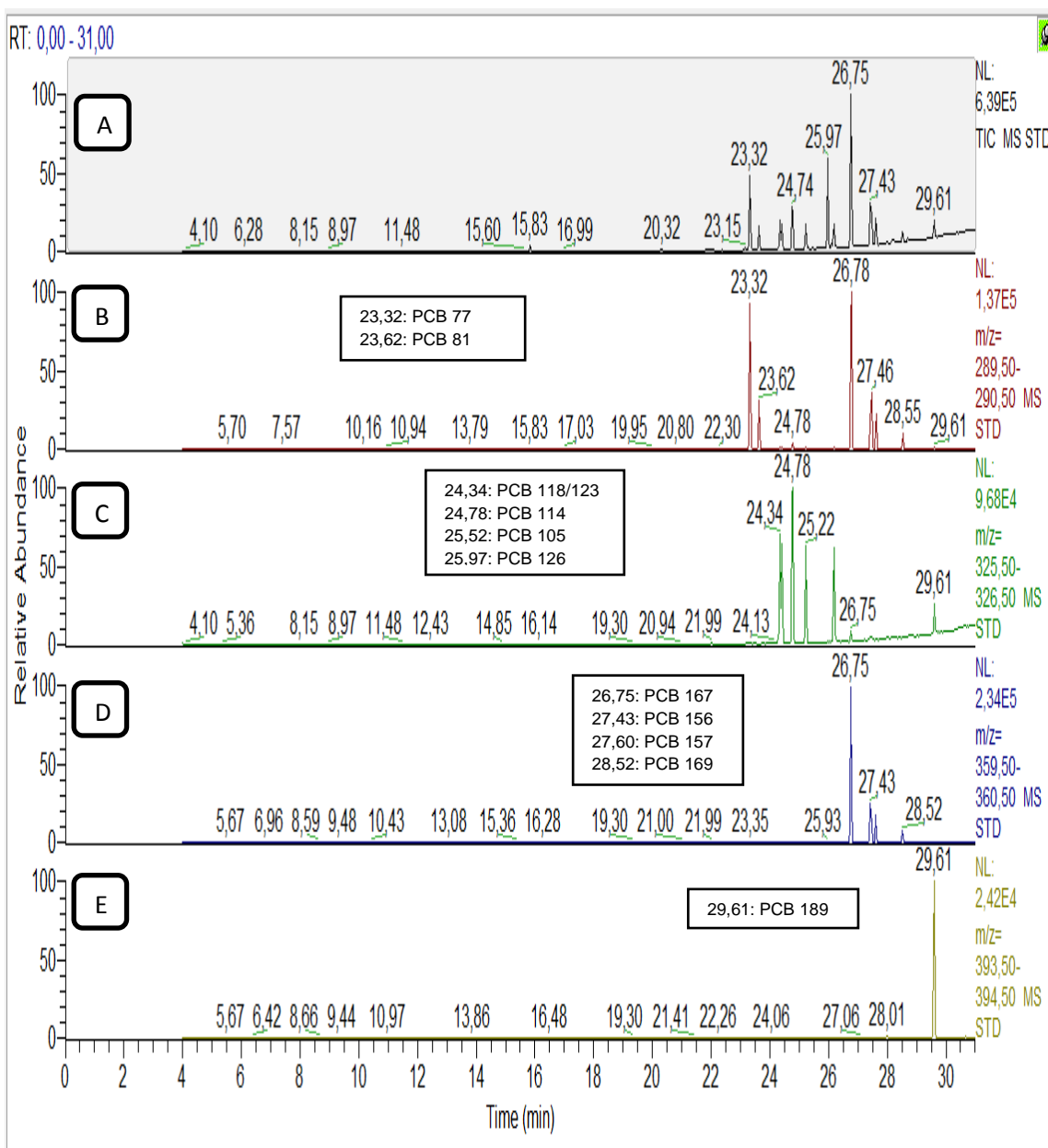


Figura 11: A) Cromatograma (TIC) de los 12 PCBs en estudio y B, C, D y E corresponden a los cromatogramas extraídos de los 12 PCBs a sus correspondientes iones de cuantificación.

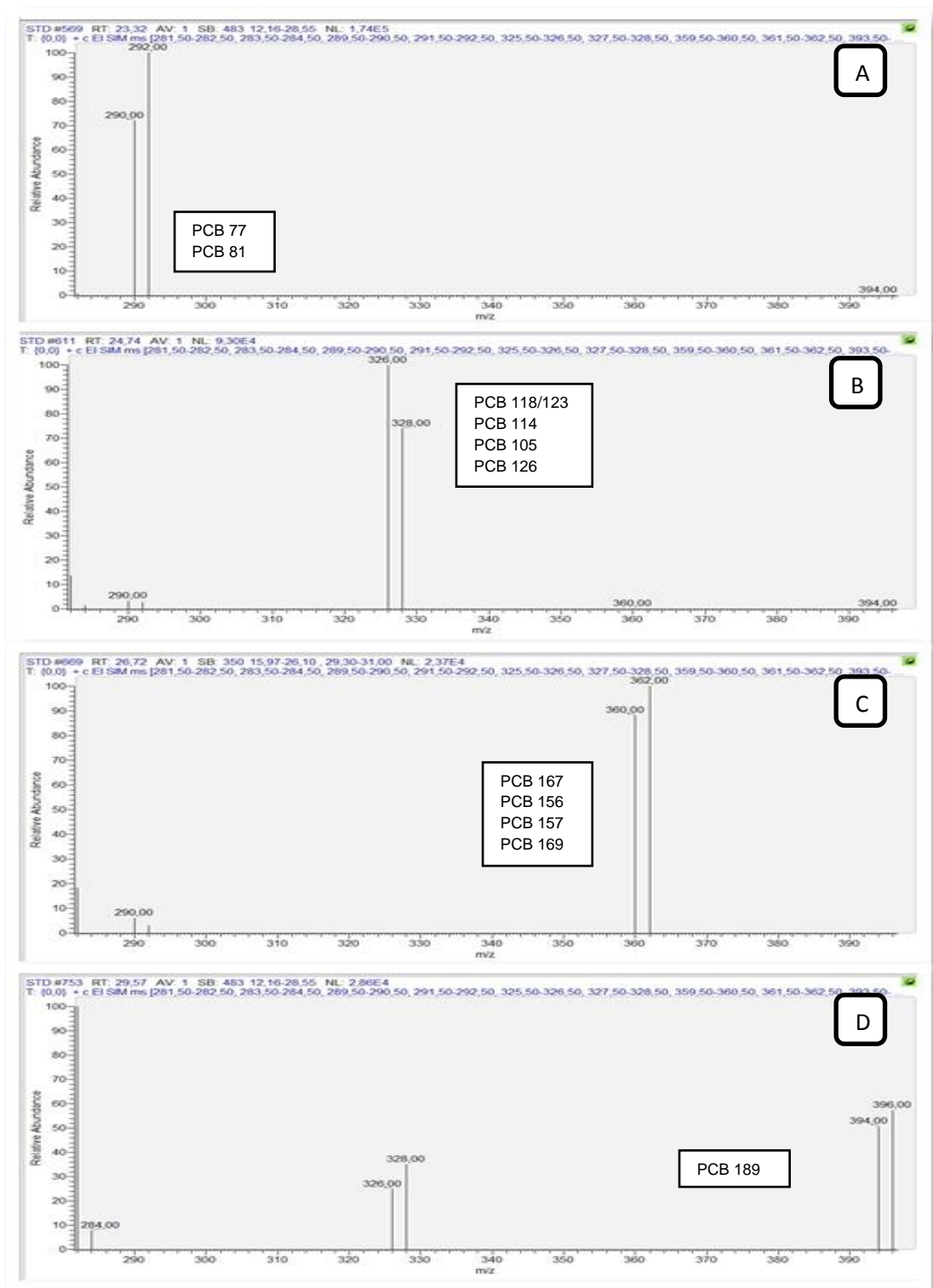


Figura 12: Espectro de masas de los 12 PCBs en estudio, agrupados de acuerdo a los iones de cuantificación y confirmación de cada congénere A) PCBs tetraclorados, B) PCBs Pentaclorados, C) PCBs Hexaclorados y D) PCB Heptaclorado.

6.3 - Curva de Calibración.

Para la cuantificación de los analitos tanto en las muestras de agua como de plantas, se usó el método de curva de calibración, para ello se prepararon multiestándares de concentración conocida de los 12 PCBs en hexano y se midió mediante GC-ECD, observándose un aumento tanto en la altura como en el área del pico correspondiente a cada PCB, como se observa en la Figura 13.

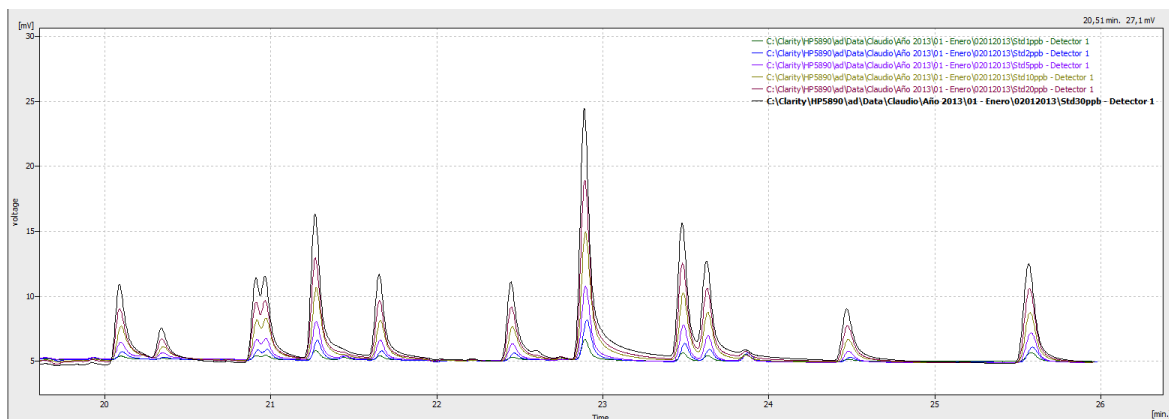


Figura 13. Cromatograma de una curva de calibración de los 12 PCBs a concentraciones de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para los cálculos se usó la relación área de la señal del analito en la muestra sobre el área de la señal del estándar interno. Este estándar se agregó al extracto a una concentración fija antes de la inyección en el cromatógrafo, con el propósito de reducir los errores asociados a la cromatografía. En la Tabla 8 se puede observar los valores de pendiente, intercepto y coeficiente de la correlación para una regresión lineal ($y = mx + n$) en cada uno de los PCBs, para la curva de calibración, mostrada en la Figura 13.

Tabla 8: Valores de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación de las curvas de calibración para cada uno de los PCBs.

	PCBs										
	77	81	118/123	114	105	126	167	156	157	169	189
Pendiente	0,0124	0,0036	0,0236	0,0266	0,0148	0,0164	0,0584	0,0248	0,0261	0,0132	0,0287
Intercepto	0,0201	0,0068	0,0467	0,0432	0,0241	0,0223	0,0846	0,0444	0,0108	0,0143	0,0357
R²	0,9920	0,9897	0,9894	0,9804	0,9956	0,9933	0,9947	0,9894	0,9807	0,9965	0,9909

6.4 - Límites de detección y cuantificación.

Se determinaron los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales midiendo la relación señal/ruido a partir de un cromatograma registrado a la concentración más baja utilizada en la curva de calibración de PCBs ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), los valores obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Límites de detección y cuantificación, y tiempos de retención, para cada uno de los analitos estudiados.

Analito	Tr min.	LD $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LC $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
HCB	14,00	-	-
PCB 77	20,05	0,06	0,20
PCB 81	20,31	0,16	0,52
PCB 105	21,61	0,05	0,15
PCB 114	21,27	0,03	0,09
PCB 118/123	20,92	0,03	0,09
PCB 126	22,41	0,05	0,18
PCB 156	23,43	0,03	0,09
PCB 157	23,58	0,03	0,11
PCB 167	22,85	0,01	0,04
PCB 169	24,42	0,07	0,22
PCB 189	25,51	0,03	0,09

Se puede observar en la Tabla 9, que los valores de LD van desde $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y que los valores de LC van desde $0,04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dependiendo de cada uno de los analitos.

6.5 - Optimización de las variables que afectan a la determinación de PCBs en muestras acuosas mediante discos recubiertos con distintas fases de extracción (PDMS, C18 y nanotubos de carbono).

Es conocido que la velocidad de rotación es una variable importante en la extracción mediante PDMS, ya que los tiempos de extracción se reducen, al disminuir la capa estacionaria de agua que se forma entre el disco rotatorio y el seno de la solución [56].

Por otra parte, en un trabajo previo, desarrollado por nuestro grupo de investigación [39] se confirmó que la extracción de nonilfenol en muestras acuosas mediante disco rotatorio, incrementa considerablemente a mayor velocidad de rotación. Por esta razón, en este estudio se trabajará a una velocidad constante de 1250 rpm.

Uno de los problemas que presenta el uso de altas velocidades de agitación, en dispositivos recubiertos totalmente con la fase de extracción (como el utilizado en SBSE) es que la fase se va deteriorando con el roce constante de ésta con el fondo del vial de extracción [34], esto no ocurre con la configuración de disco rotatorio, ya que la fase nunca entra en contacto con el fondo del vial, permitiendo velocidades de agitación mayores en comparación con SBSE, lo que permite alcanzar el equilibrio de partición de forma más rápida.

6.5.1 - Estudio del efecto del % metanol y % NaCl

Se ha observado en estudios previos que la adición de NaCl y metanol son factores que pueden afectar las condiciones de extracción de compuestos orgánicos desde matrices acuosas, dependiendo de su polaridad [68 - 70].

El NaCl se agrega para modificar la fuerza iónica de la solución. El efecto “salting-out” es usado en química analítica para maximizar la eficiencia de extracción de analitos que tengan alguna solubilidad en agua, por la adición de sal a muestras acuosas.

Se ha observado que para analitos hidrofóbicos ($\log K_{OW} > 3$) la adición de una sal inerte como el NaCl no mejora la eficiencia de extracción, si no que más bien la reduce. Para explicar esta disminución en la respuesta, se han dado varias hipótesis, la primera de ellas es el “efecto aceite” que promueve el movimiento de los compuestos no polares a la superficie del agua, reduciendo la interacción con la fase de PDMS [70, 71]. Otros autores

atribuyen esta disminución de la eficiencia de extracción de los analitos hidrofóbicos como el resultado del aumento de la viscosidad de la solución acuosa al agregar la sal, lo que haría más lenta la cinética de extracción de estos compuestos [70, 72]. Contrariamente, en el caso de los analitos polares, la adición de una sal inerte en la muestra acuosa reduce la solubilidad de estos compuestos en el agua, mejorando la eficiencia de la extracción [70, 73].

Por su parte, la adición de modificadores orgánicos, como metanol, puede evitar la adsorción de compuestos no polares, como los PCBs, en las paredes del contenedor de vidrio, además al adicionar este modificador, puede aumentarse la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, permitiendo que atraviesen más fácilmente la capa estancada de agua, aumentando la eficiencia de la extracción. Sin embargo la adición de estos modificadores también puede aumentar la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, y por lo tanto, reducir la eficiencia de extracción. En términos generales, se ha establecido que para compuestos con $\text{Log } K_{OW} > 5$, la adición de MeOH evita la adsorción de los analitos en las paredes del vial de vidrio, mientras que para los compuestos con $\text{Log } K_{OW}$ menores, el MeOH aumenta la solubilidad de estos compuestos en la solución disminuyendo el equilibrio de partición entre la solución acuosa y el PDMS [70].

En este caso, se estudiaron simultáneamente las variables, % MeOH (0 – 20 v/v) y % NaCl (0– 20 % p/p) en la muestra, mediante Statgraphics Centurion XV a través de un DCC que se describió previamente en la metodología. Para este estudio se utilizaron 50 mL de muestra, una velocidad de rotación de 1250 rpm, un tiempo de 180 minutos y una concentración de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para los analitos.

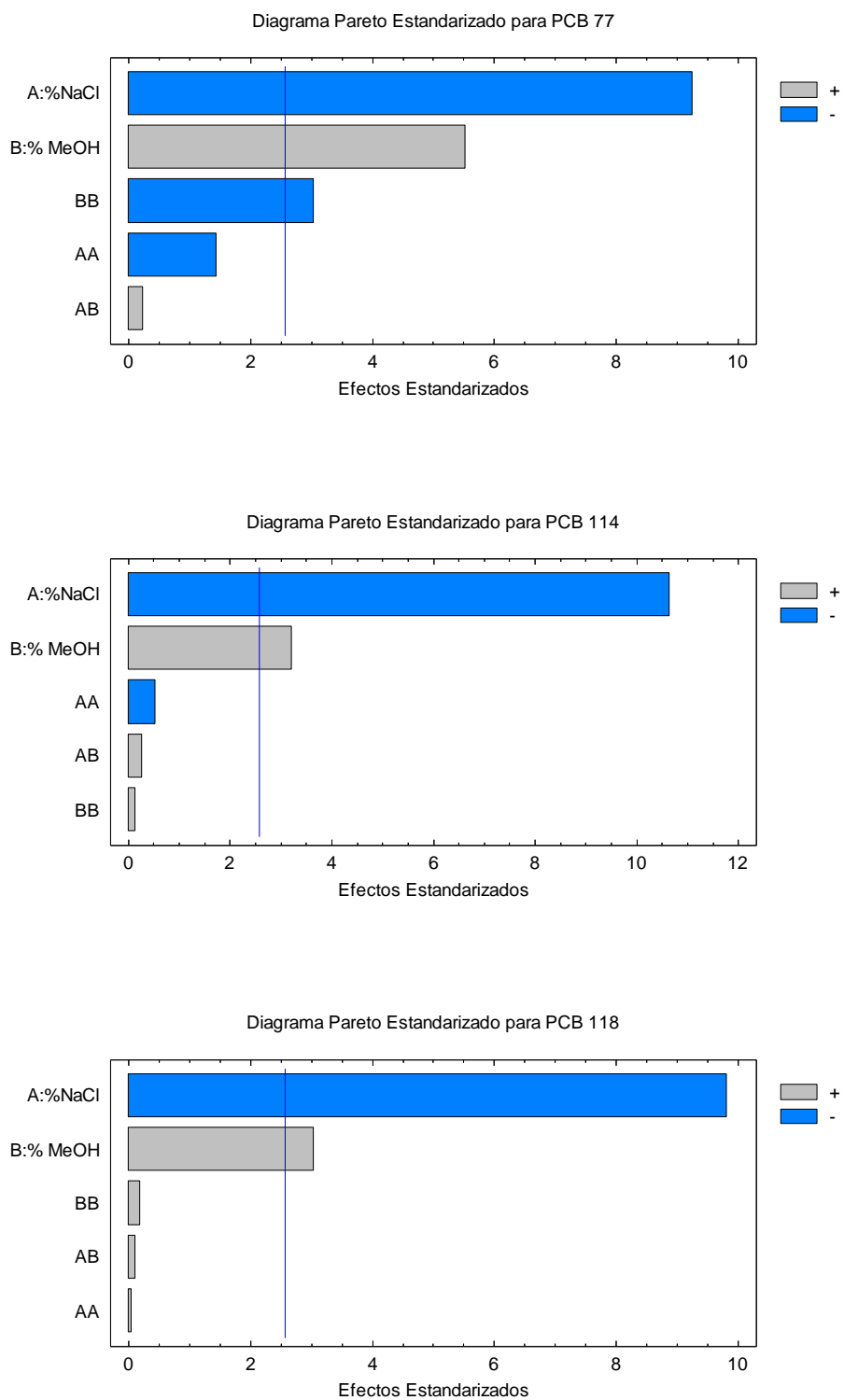


Figura 14.A. Diagramas de Pareto estandarizado para los PCBs 77, 114 y 118.

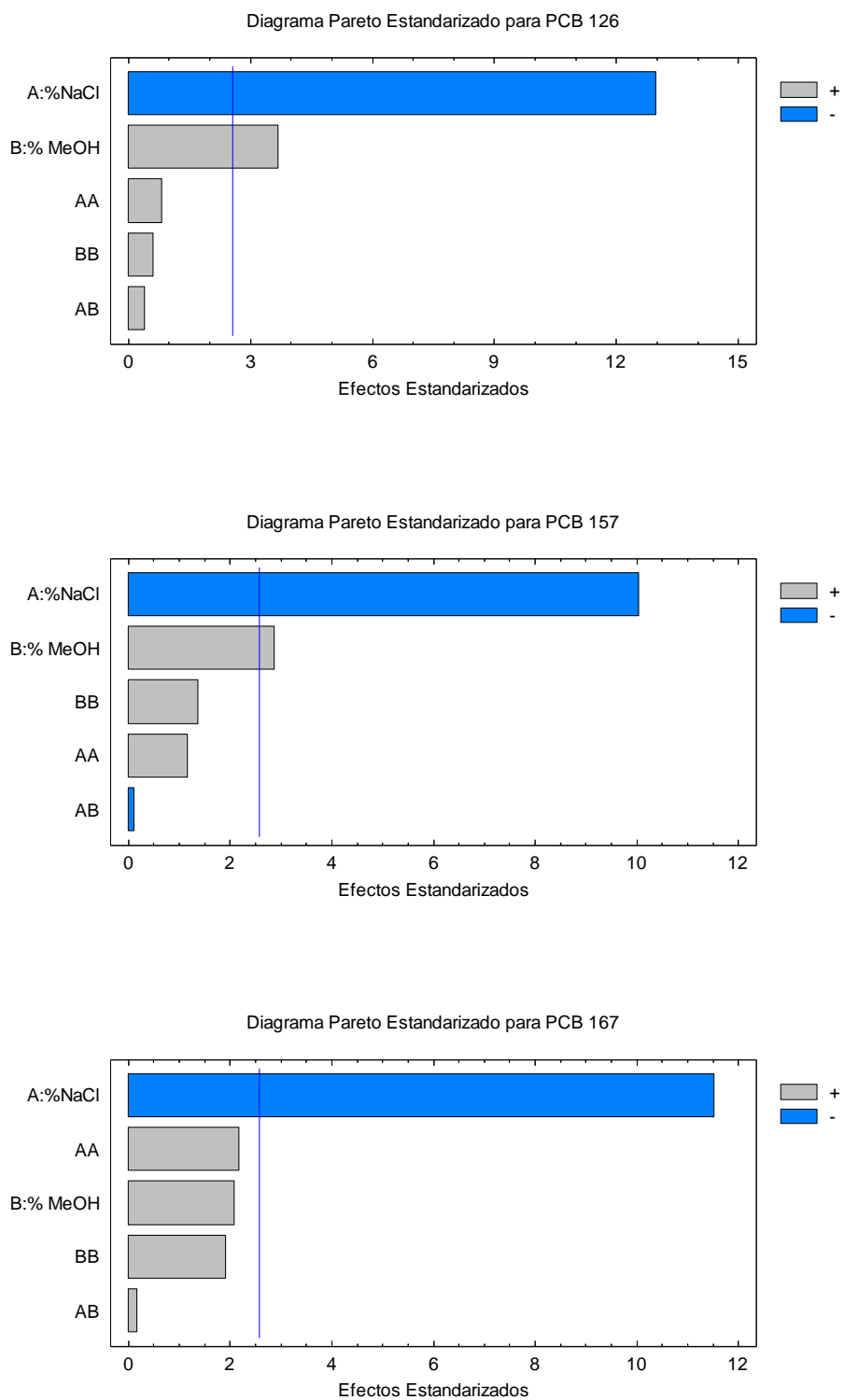


Figura 14.B. Diagramas de Pareto estandarizado para los PCBs 126, 157 y 167.

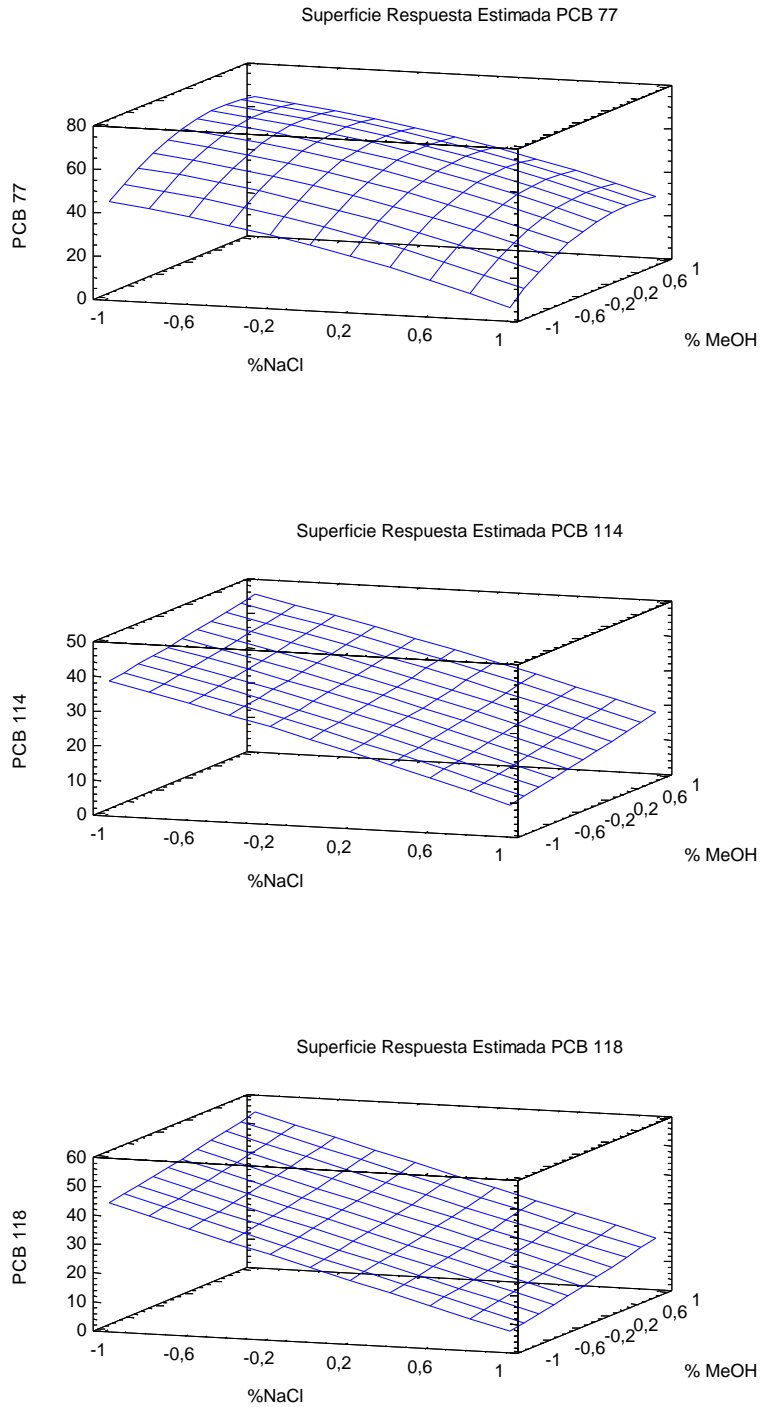


Figura 15.A Superficies de respuesta estimadas para los efectos de NaCl y Metanol para los PCBs 77, 114 y 118.

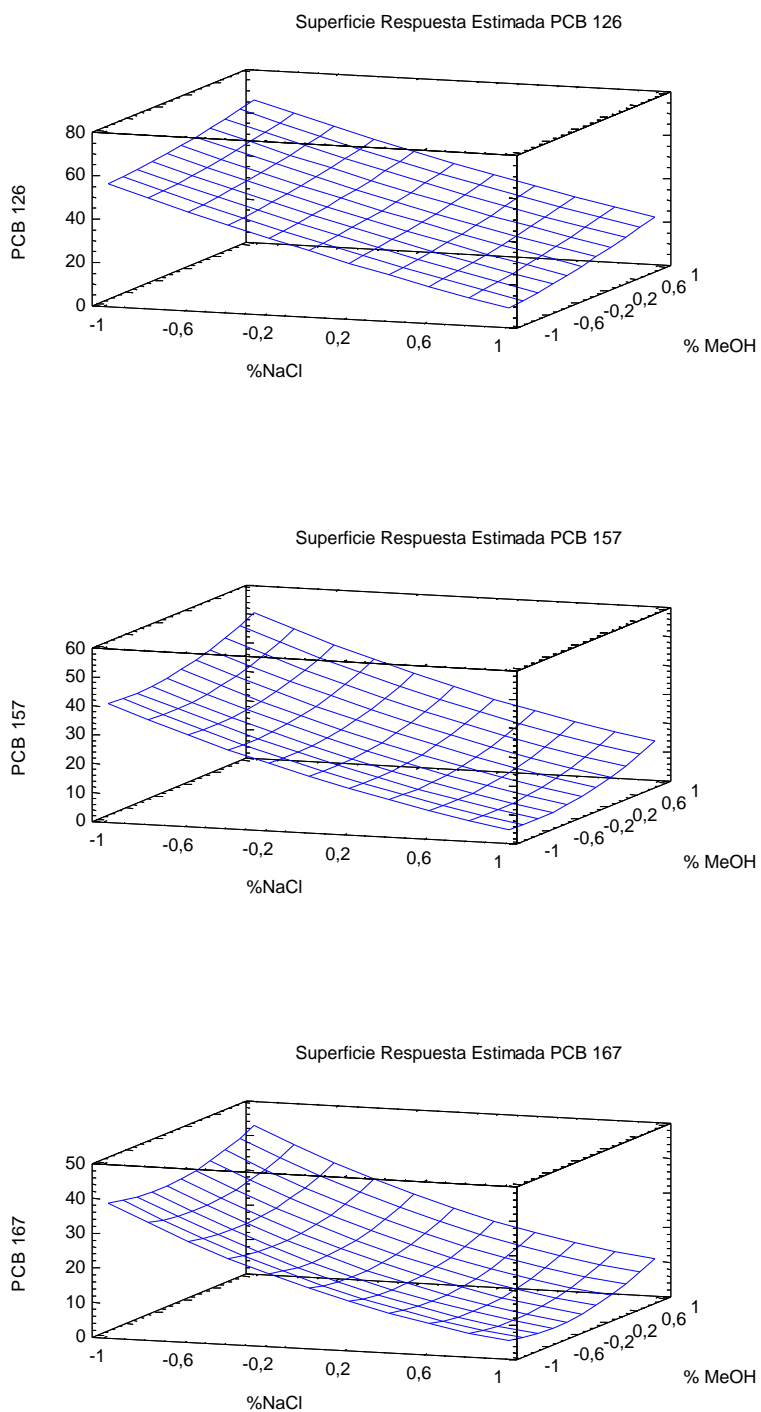


Figura 15.B Superficies de respuesta estimadas para los efectos de NaCl y Metanol para los PCBs 126, 157 y 167.

De las Figuras 14.A y 14.B se pueden observar el efecto negativo que tiene el tratamiento de la muestra con NaCl en la extracción de los PCBs, corroborando que la adición de este modificador no mejora la extracción de estos analitos. En cambio se puede observar el efecto positivo que presenta el metanol (MeOH), siendo significativa su influencia en la extracción de la mayoría de los compuestos PCBs.

De acuerdo a las superficies de respuestas mostradas en las Figuras 15.A y 15.B también se puede observar lo mismo, el efecto negativo del NaCl y positivo del MeOH en la extracción de estos analitos.

La aplicación de la función de compromiso, ofrece ciertas ventajas en química analítica, como la eficiencia, economía y objetividad de la optimización de los procedimientos que poseen respuestas múltiples. La función de "Deseabilidad de Derringer" es la más utilizada, ya que nos permite establecer las mejores condiciones para la extracción de todos los PCBs en estudio. Se obtuvo como resultado la superficie de respuesta para el parámetro de deseabilidad que se observa en la Figura 16.

Para la cantidad de metanol, se puede ver que se obtiene la mayor recuperación al nivel mayor seleccionado para el estudio, en cambio para la cantidad de NaCl las mejores recuperaciones se obtienen con la variable menor seleccionada para el estudio, por estas razones se obtuvo como resultado óptimo un 18 % de MeOH y un 0,05 % de NaCl en la extracción de los analitos.

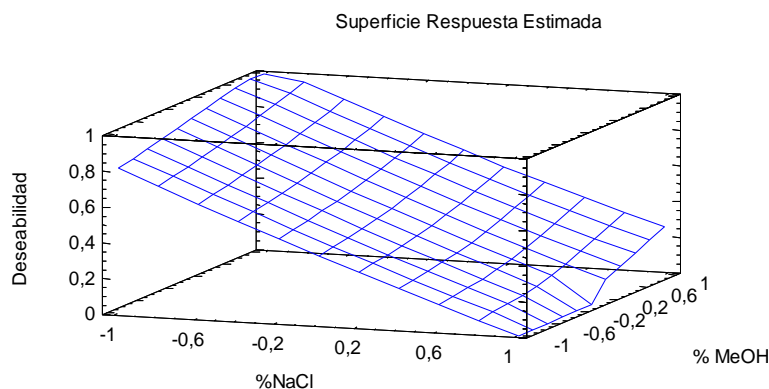


Figura 16: Superficie de respuesta múltiple estimada para la extracción de PCBs desde matrices acuosas.

Finalmente, de acuerdo a este estudio se optó por trabajar en los siguientes experimentos con un porcentaje constante de 20% de MeOH, y en ausencia de NaCl en la solución.

6.5.2 - Estudio de distintas fases de extracción

Se determinaron los tiempos de equilibrio utilizando distintas fases para la extracción de los analitos, las cuales fueron adheridas sobre el disco rotatorio de teflón como se muestra en la Figura 17. Las fases utilizadas fueron: octadecil C18, PDMS y nanotubos de carbono multipared (MWCNT). Este estudio fue realizado a una velocidad de rotación constante de 1250 rpm, utilizando un 20% de metanol y a un volumen de 50 mL de muestra.



Figura 17: diversas fases adheridas al disco de teflón, de izquierda a derecha C18, PDMS, MWCNT.

Las Figuras 18.A, 18.B y 18.C muestran los perfiles de tiempo de extracción para los analitos en las distintas fases estudiadas y la Tabla 10 resume los respectivos tiempos de equilibrio para cada analito en cada una de las fases. Se puede apreciar que los mayores tiempos de equilibrio de partición de los PCBs se alcanzan en la fase de PDMS, llegando incluso cerca de los 400 min. para los compuestos más apolares.

Por su parte, para la fase de octadecil C18, se logra llegar al equilibrio antes de los 80 min, para la mayoría de los analitos y una situación similar ocurre con la fase de nanotubos de carbono.

Este hecho se puede explicar por la mayor área superficial efectiva que presentan las fases sólidas de C18 y MWCNT, respecto del PDMS, en la cual además de la adsorción de los analitos, ocurre principalmente una absorción dentro de la fase, esto se puede observar en la Tabla 11 con los valores de área BET medidos a cada una de las fases utilizadas en este estudio.

Respecto de las recuperaciones (Tabla 12), las mejores se obtienen para la fase de PDMS, obteniéndose valores entre 76,1y 97,3%, seguido de los nanotubos de carbono (entre 51,6 y 88,1) y octadecil C18 (entre 61,9 y 68,3%), obteniéndose valores de mayor similitud en esta última fase.

Las menores recuperaciones obtenidas tanto en C18 como en nanotubos de carbono, podrían deberse en principio a la menor cantidad de fase inmovilizada sobre el disco

(aproximadamente 0,055 g para C18, 0,020 g para nanotubos, 0,1830 g para PDMS y 0,1570 g para PVMQ).

Una segunda opción a estas bajas recuperaciones, es que los PCBs al ser apolares ($\log K_{OW}$ entre 5 – 7), queden muy retenidos tanto en la fase de C18 como en MWCNT y por tanto, no sean capaces de desorberse con metanol en el tiempo establecido de 45 minutos, como ocurre con el PDMS.

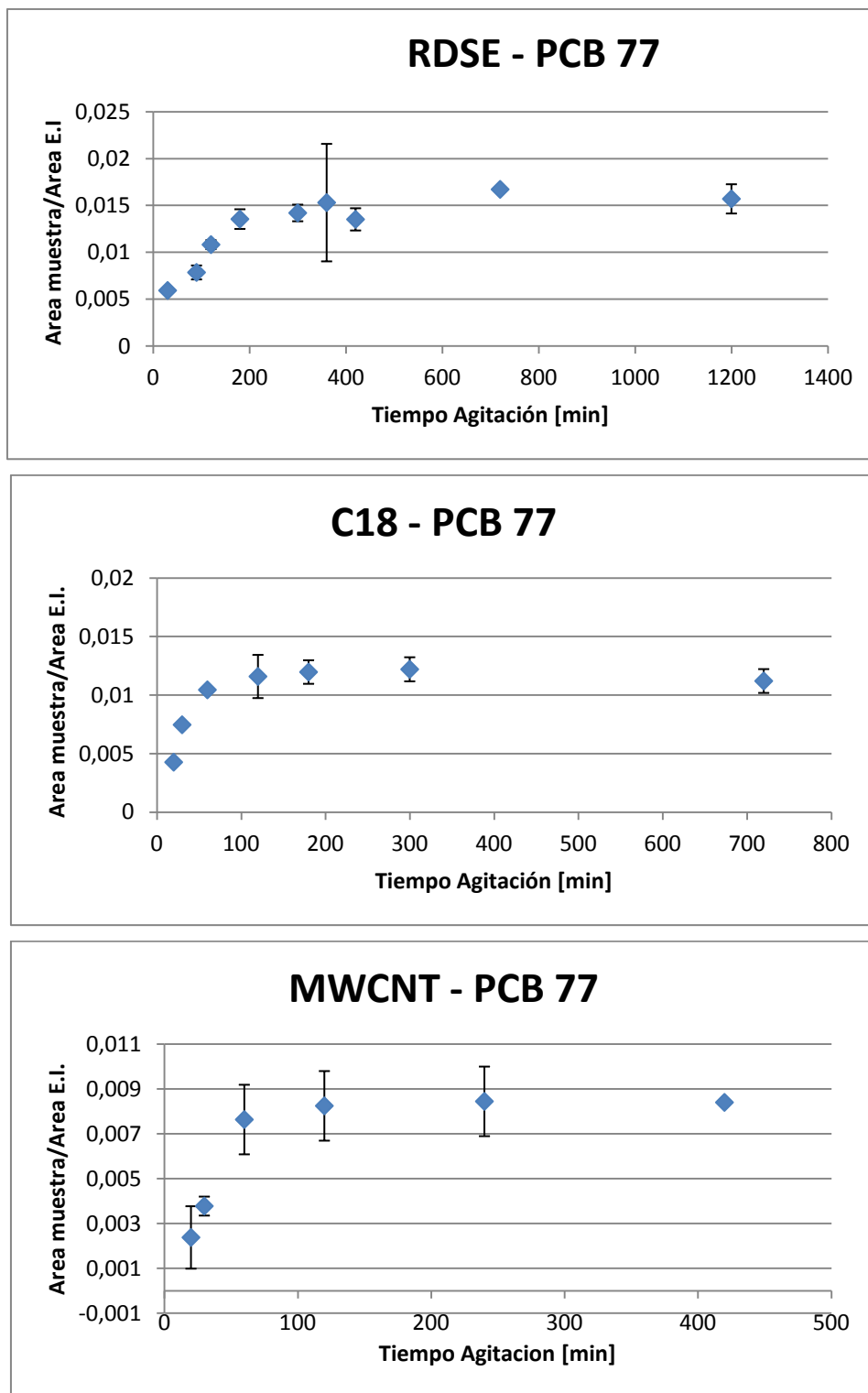


Figura 18.A: Perfiles de extracción para PCB 77 en las diversas fases de extracción.

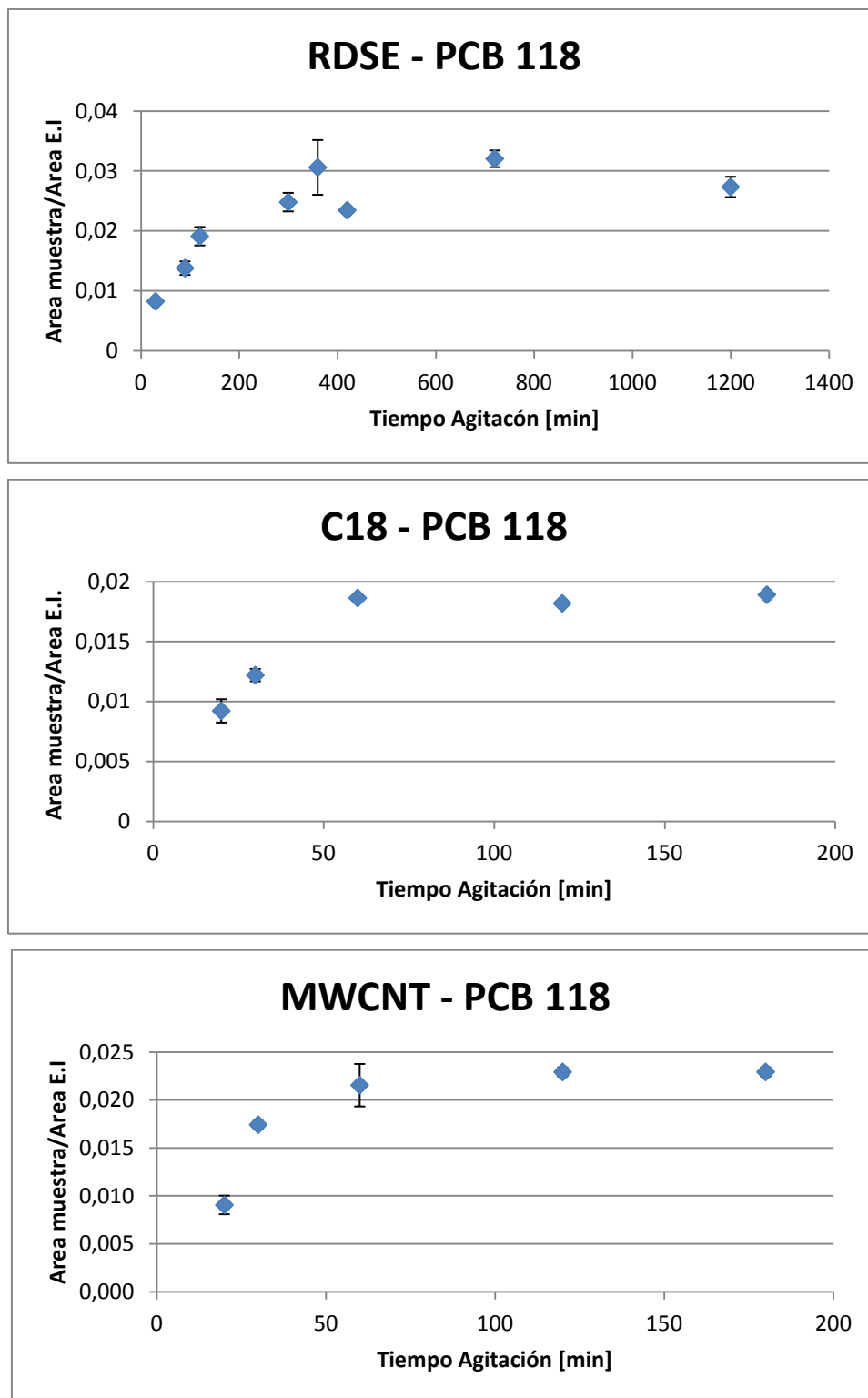


Figura 18.B: Perfiles de extracción para PCB 118 en las diversas fases de extracción.

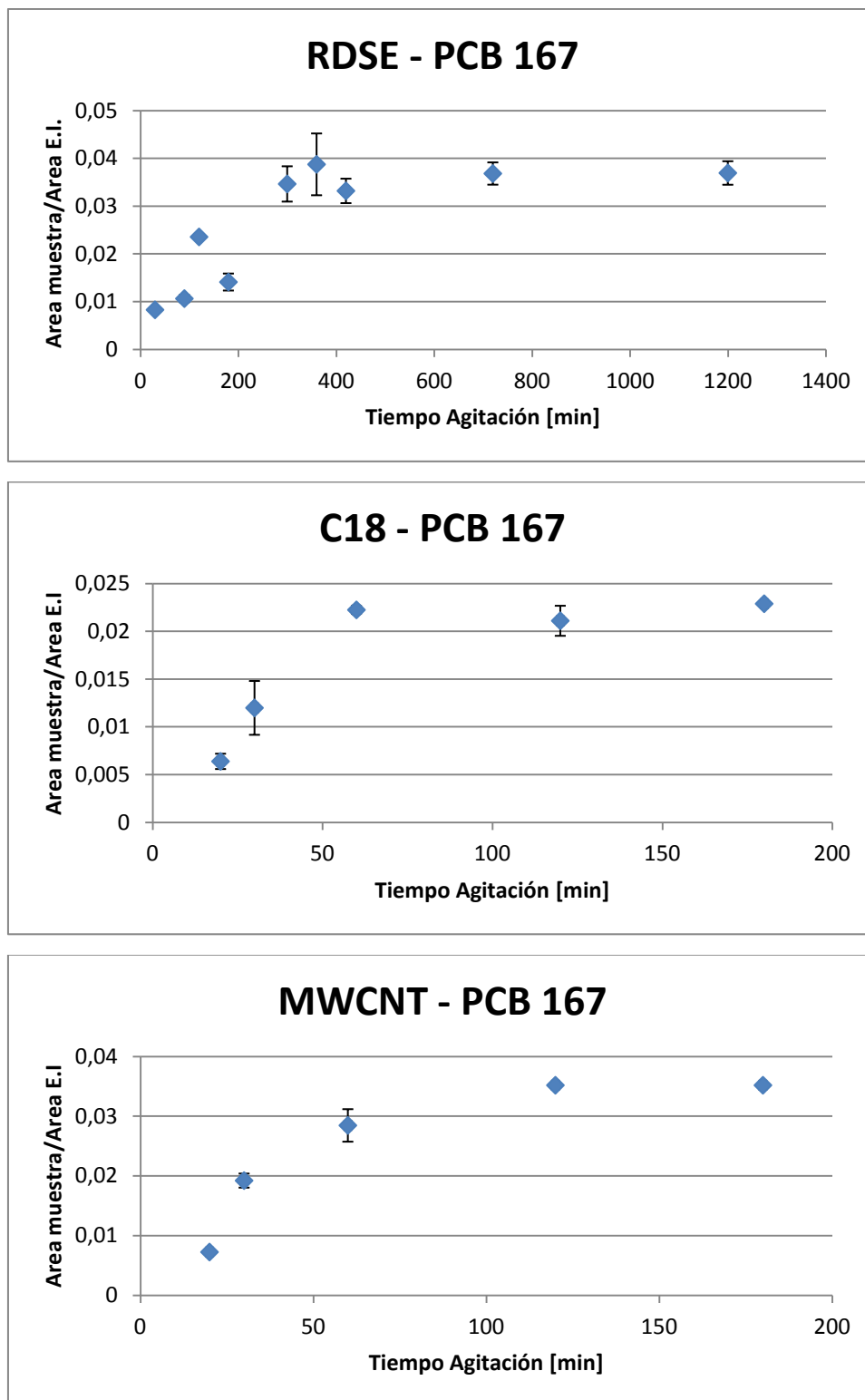


Figura 18.C: Perfiles de extracción para PCB 167 en las diversas fases de extracción.

Tabla 10: Tiempos de equilibrio para la extracción de PCBs mediante las distintas fases de extracción.

PCBs	Tiempos de equilibrio (min)			
	PDMS	C18	MWCNT	PMVQ
77	240	130	120	85
81	250	140	100	90
105	175	80	95	100
114	180	60	110	120
118/123	270	75	80	95
126	160	75	65	120
156	290	95	110	100
157	310	60	60	110
167	390	50	65	110
169	210	75	80	90
189	350	80	90	120

Un problema que ocurre con la fase de nanotubos de carbono adherida directamente en el disco, es la pérdida de fase mientras éste se agitaba durante el proceso de extracción (los MWCNT se desprenden del disco), por esta razón, se diseñó un nuevo dispositivo de disco rotatorio, el cual presenta una cavidad en su parte superior donde se colocan libres los MWCNT y se cubren con un filtro poroso, que deja pasar la muestra acuosa donde se encuentran los PCBs hacia los MWCNT y no permite que éstos se desprendan del sistema, evitando así su pérdida durante el proceso de extracción, tal como se puede observar en la Figura 19.

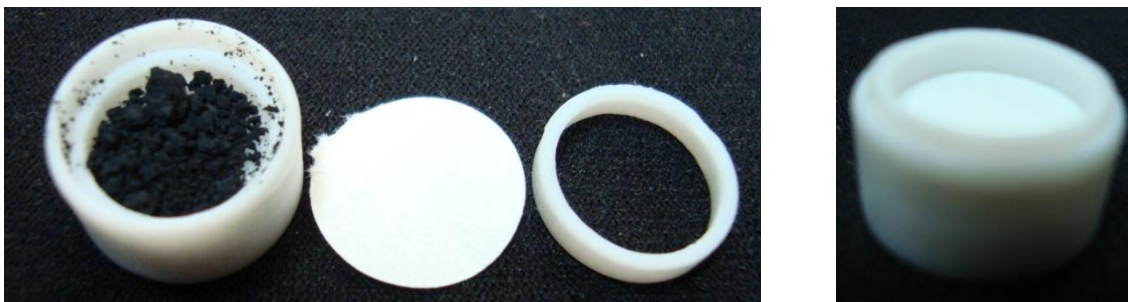


Figura 19: Diseño del nuevo dispositivo de RDSE para el uso con MWCNT.

Mediante este nuevo dispositivo de disco rotatorio con MWCNT se estudió nuevamente el tiempo de equilibrio de extracción de los analitos obteniéndose los siguientes perfiles de tiempo de extracción, los que se muestran en las Figuras 20.A y 20.B. Se puede observar que aproximadamente a los 30 - 40 minutos se obtiene el equilibrio para la extracción de estos compuestos.

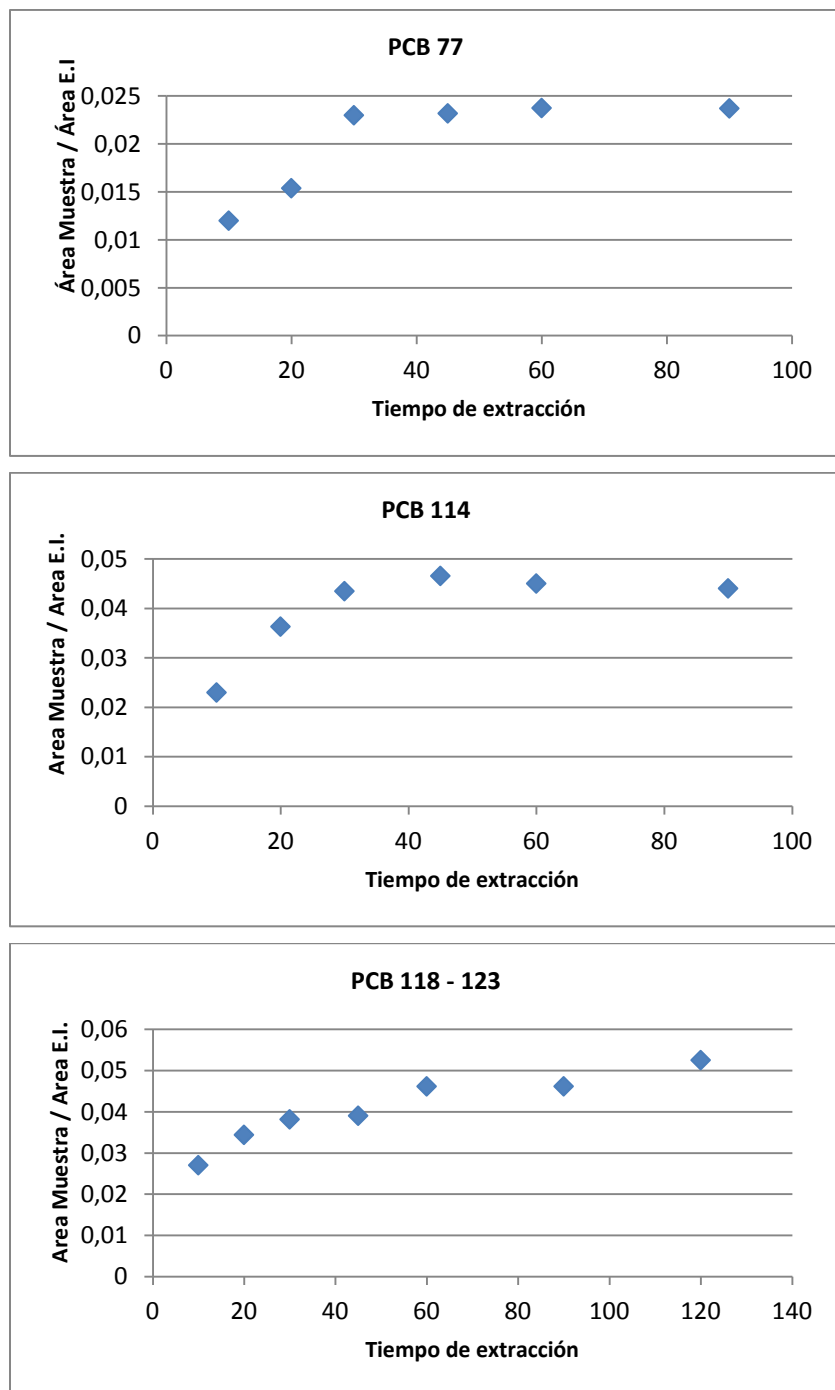


Figura 20.A: Perfiles de extracción de los distintos PCBs (77, 114, 118/123) representativos mediante el nuevo dispositivo de disco rotatorio con MWCNT.

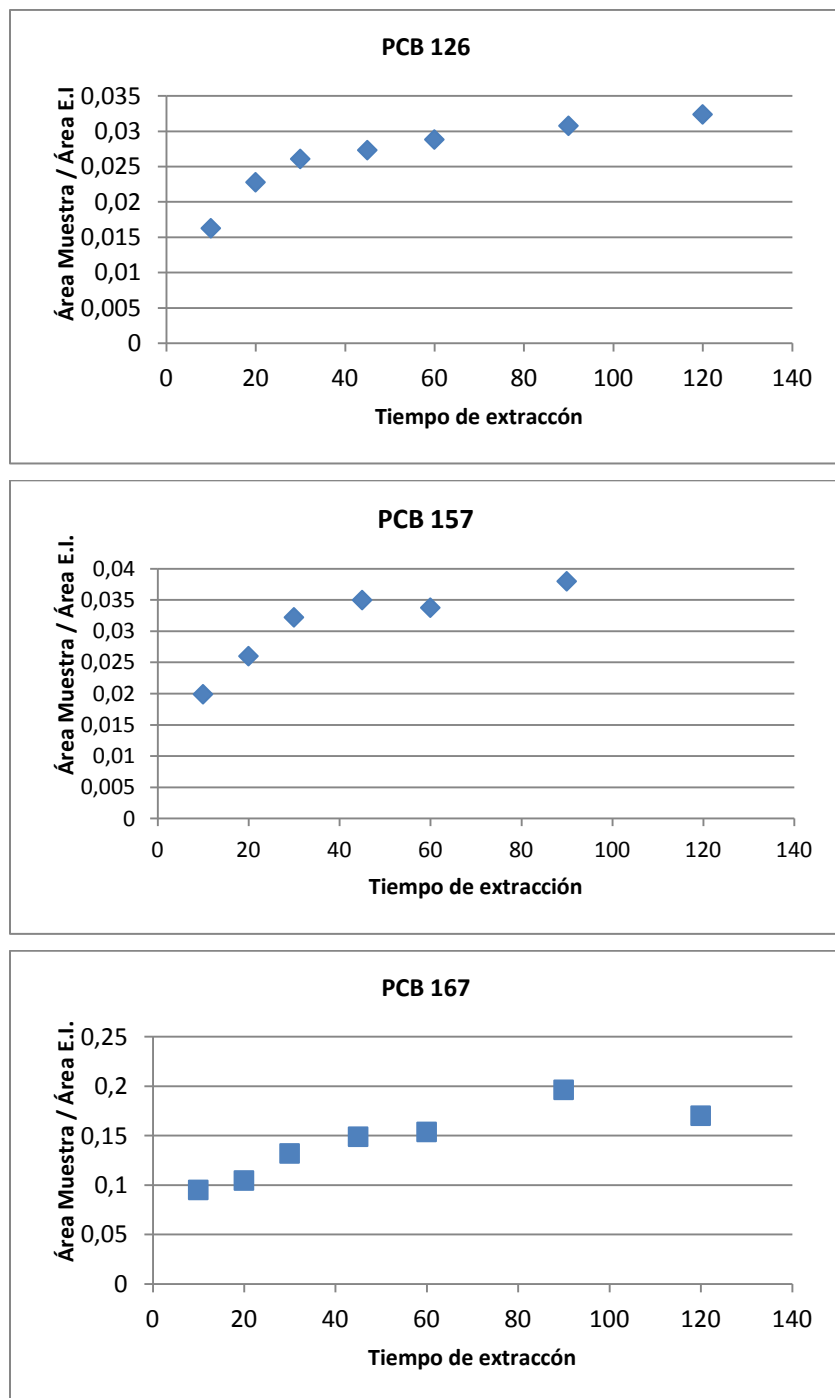


Figura 20.B: Perfiles de extracción de los distintos PCBs (126, 157, 167) representativos mediante el nuevo dispositivo de disco rotatorio con MWCNT.

Adicionalmente se evaluó la fase que se utiliza en la extracción con vara de silicona (SRE) que utiliza el polímero PVMQ, técnica descrita previamente [74, 75] pero en este caso, la fase también fue inmovilizada sobre la superficie del disco rotatorio. El polímero PVMQ es similar al PDMS, pero además de radicales metilo, contiene radicales vinilo y fenilo.

Se puede observar en las Figuras 21.A y 21.B que aproximadamente a los 150 minutos de agitación, se llega al equilibrio de extracción utilizando la fase PVMQ inmovilizada sobre disco rotatorio. El menor tiempo de equilibrio respecto de PDMS se debe a la mayor porosidad de esta fase, lo que facilitaría el transporte de masa desde el seno de la solución hasta la fase PVMQ, aumentando así la velocidad de extracción disminuyendo considerablemente los tiempos de extracción, lo que se pudo corroborar con la micrografía SEM (Figura 22) realizada a ambas fases. La fase PVMQ, al ser más porosa que PDMS, posee una mayor área superficial efectiva, permitiendo una extracción cuantitativa en un menor tiempo. Esto se pudo comprobar mediante la determinación del área BET a todas las fases de extracción, obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores de Área BET de las diferentes fases usadas en RDSE.

	Área BET	
	[m ² /g]	σ
PDMS	0,07872	0,0028
PVMQ	0,1425	0,013
C18	199,5	1,44
MWCNT	43,99	0,4256

Se puede observar que el valor de área correspondiente a PVMQ es mayor que el área de PDMS lográndose así recuperaciones cuantitativas en un menor tiempo de extracción.

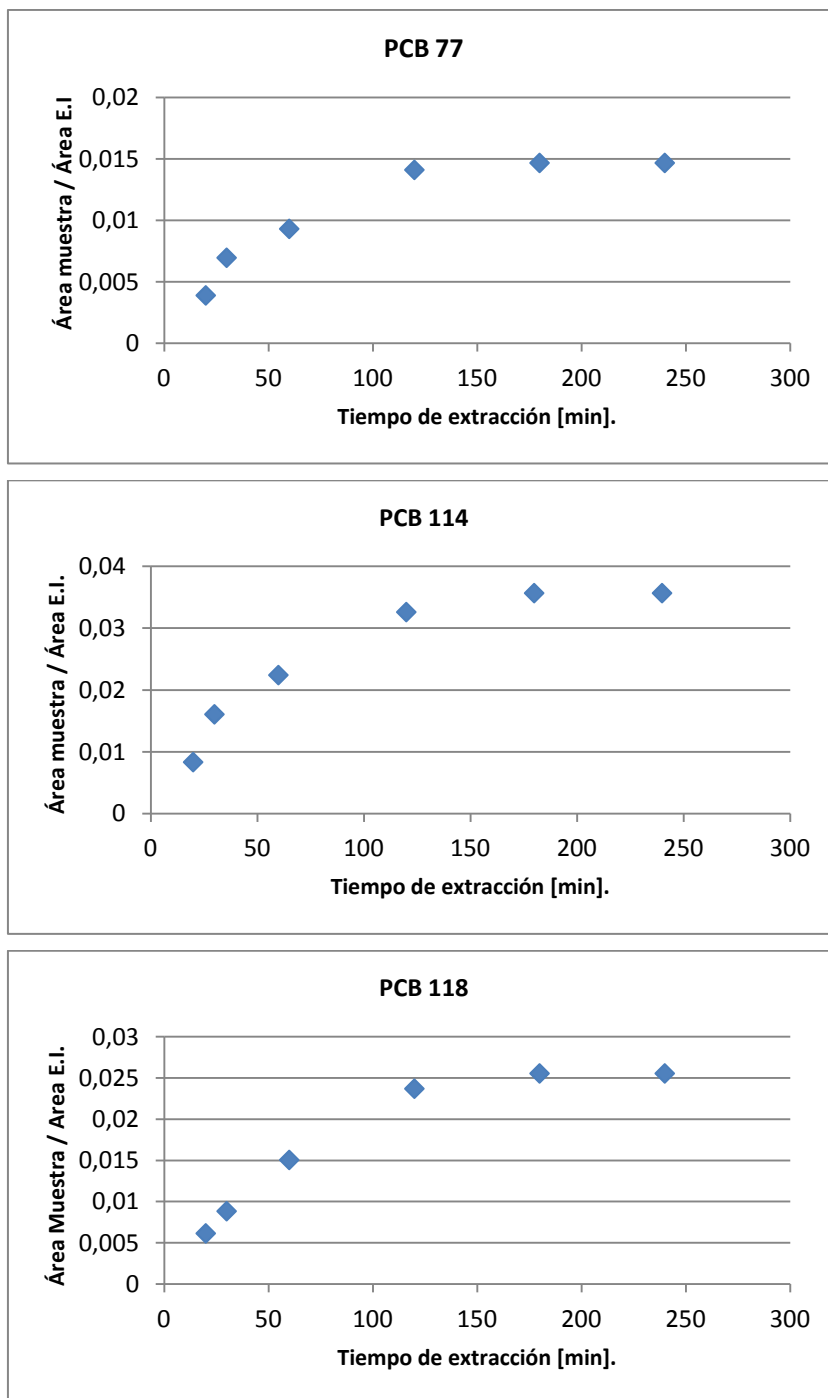


Figura 21.A: Perfiles de extracción para algunos PCBs representativos (77, 114, 118) mediante el uso de la fase PVMQ inmovilizada sobre el disco rotatorio.

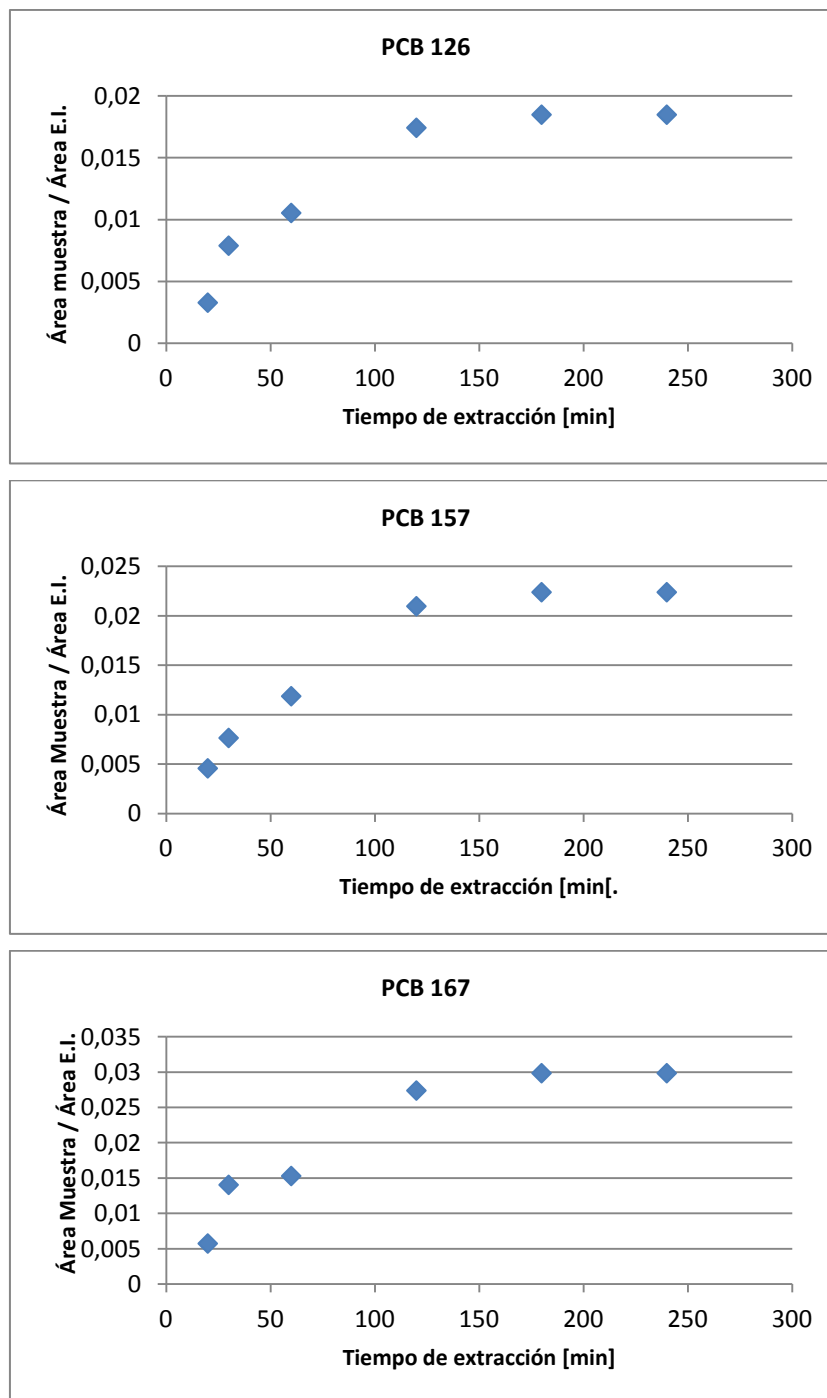


Figura 21.B: Perfiles de extracción para algunos PCBs representativos (126, 157, 167) mediante el uso de la fase PVMQ inmovilizada sobre el disco rotatorio.

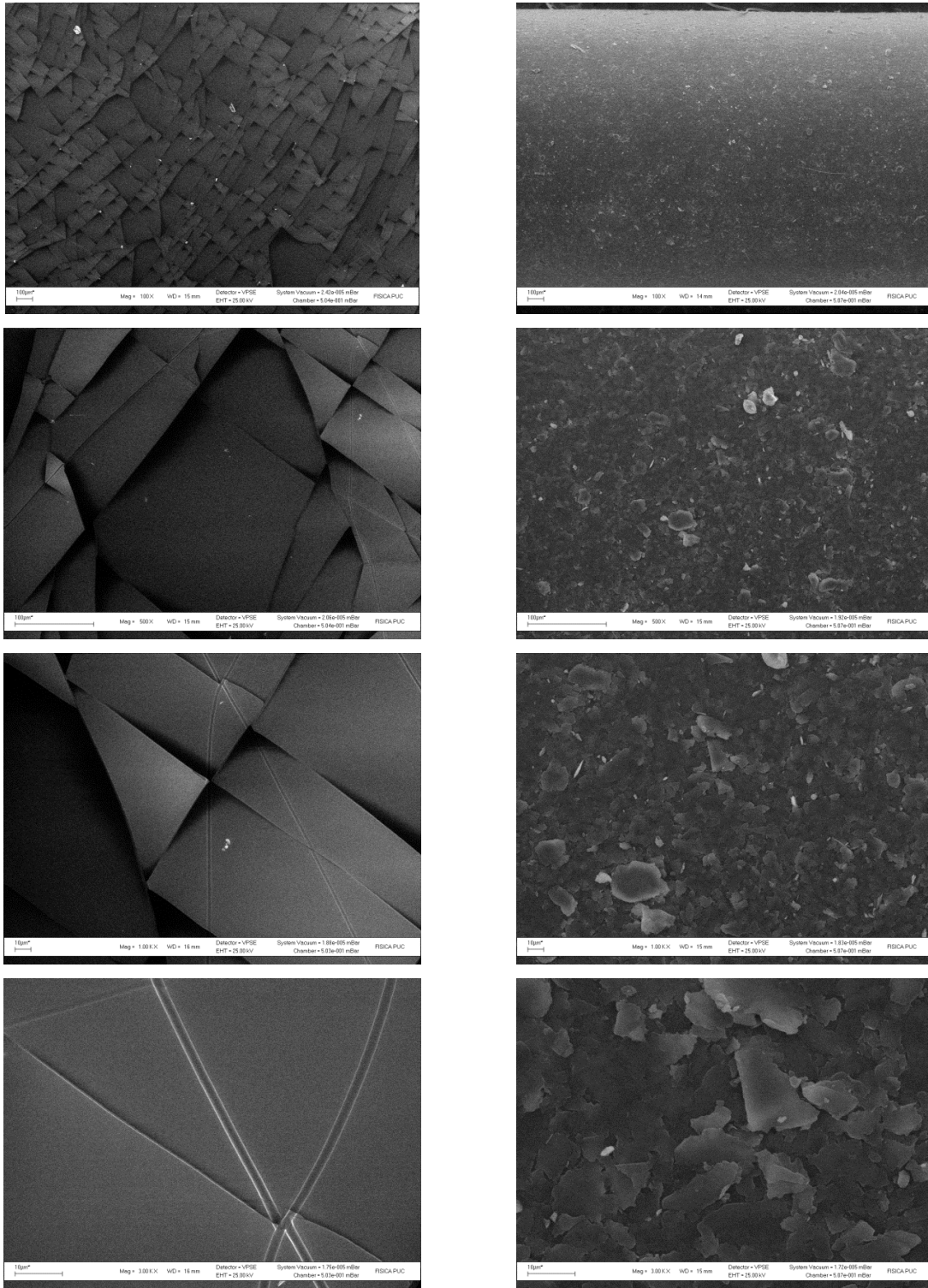


Figura 22: Micrografías SEM de las fases PDMS (izquierda) PMVQ (derecha) usadas en RDSE, aumentadas a 100X, 500X, 1000X y 3000X.

Respecto a las recuperaciones obtenidas con la fase PVMQ, se puede observar en la Tabla 12 que éstas son similares a las obtenidas con PDMS, aun cuando el volumen de fase es levemente menor en PVMQ respecto de la fase de PDMS (0,152 cm³ en la PVMQ vs 0,176 cm³ en el PDMS del disco rotatorio). Un cálculo teórico de las recuperaciones de acuerdo a la ecuación 1, nos indica que en ambos casos estarían por sobre el 80%, siendo ambas consideradas como cuantitativas.

Por su parte, las recuperaciones obtenidas en las fases C18 y MWCNT, tanto para cada uno de los PCBs como las recuperaciones totales promedio, son menores que las obtenidas para PDMS y PMVQ, esto se debe a la posible saturación que existe en las fases sólidas ya que existe principalmente un proceso de adsorción, que es un proceso superficial, en comparación a las otras fases (PVMQ y PDMS) donde además existe un proceso de absorción, por otro lado, la adsorción en las fases solidas puede ser tan fuerte que la desorción no sería total, en el tiempo asignado para ella, pudiendo quedar los analitos atrapados en las fases sólidas.

Tabla 12: Comparación de las recuperaciones (%) obtenidas mediante disco rotatorio con las distintas fases usadas para extraer.

PCBs	FASES DE EXTRACCION			
	PDMS	PMVQ	C18	MWCNT*
PCB 77	88,3	95,4	61,9	53,5
PCB 81	89,4	93,2	63,5	55,2
PCB 105	87,3	91,1	65,9	68,4
PCB 114	76,1	86,9	64,5	82,6
PCB 118/123	79,9	87,2	68,3	78,2
PCB 126	97,3	81,0	65,6	51,6
PCB 156	95,2	83,5	66,7	85,6
PCB 157	76,3	73,1	61,9	88,1
PCB 167	73,9	67,1	64,5	79,0
PCB 169	81,5	79,9	66,3	81,4
PCB 189	88,6	89,5	72,6	77,9

*Configuración 2 de MWCNT.

6.5.3 - Estudio del volumen de muestra.

De acuerdo a lo que predice la ecuación 1, la recuperación depende de la razón de fases β (volumen de agua sobre volumen de PDMS), por esta razón es que a altos volúmenes de muestra debería disminuir la eficiencia de la extracción [67]. Por otra parte, la recuperación también depende del Log Kow, de manera que para compuestos de muy baja polaridad, un aumento del volumen de muestra favorecería la preconcentración de los analitos sobre la fase apolar.

En este estudio, al disminuir el volumen de muestra de 40 mL. a 8 mL., manteniendo constante la velocidad de agitación de 1250 rpm. y el porcentaje de MeOH (20%), se obtuvieron tiempos de equilibrio menores, como se puede observar en la Tabla 13, lo que puede deberse a que los analitos recorren menores distancias desde el seno de la solución hasta la fase de PDMS. El efecto del modificador (MeOH) también favorece la extracción, evitando la adsorción de los analitos en las paredes del vial de extracción y también ayuda a que los analitos atraviesen la capa estancada de agua, que se forma en la parte superior de la fase de PDMS, disminuyendo el tiempo de extracción y aumentando las recuperaciones de las extracciones.

En general, como ese puede observar en Tabla 14, todas las recuperaciones aumentaron en algún porcentaje, dependiendo del analito para las fases PDMS, PMVQ y C18. En el caso de los MWCNT, las recuperaciones varían, para algunos aumenta y para otros disminuye, esto se puede deber, en un primer lugar, al cambio en la configuración en el uso de los MWCNT, ya que en los primeros estudios, los nanotubos estaban en contacto directo con la solución que contenía los PCBs, en cambio en los estudios posteriores, hay un filtro poroso, de celulosa, el cual los analitos deben atravesar hasta llegar a los nanotubos, en segundo lugar a que los PCBs estudiados son apolares (LogK_{ow} 5 -7), que éstos se quedan sorbidos en la fase MWCNT, no desorbiéndose totalmente en el metanol durante los 45 minutos establecidos como periodo de desorción,

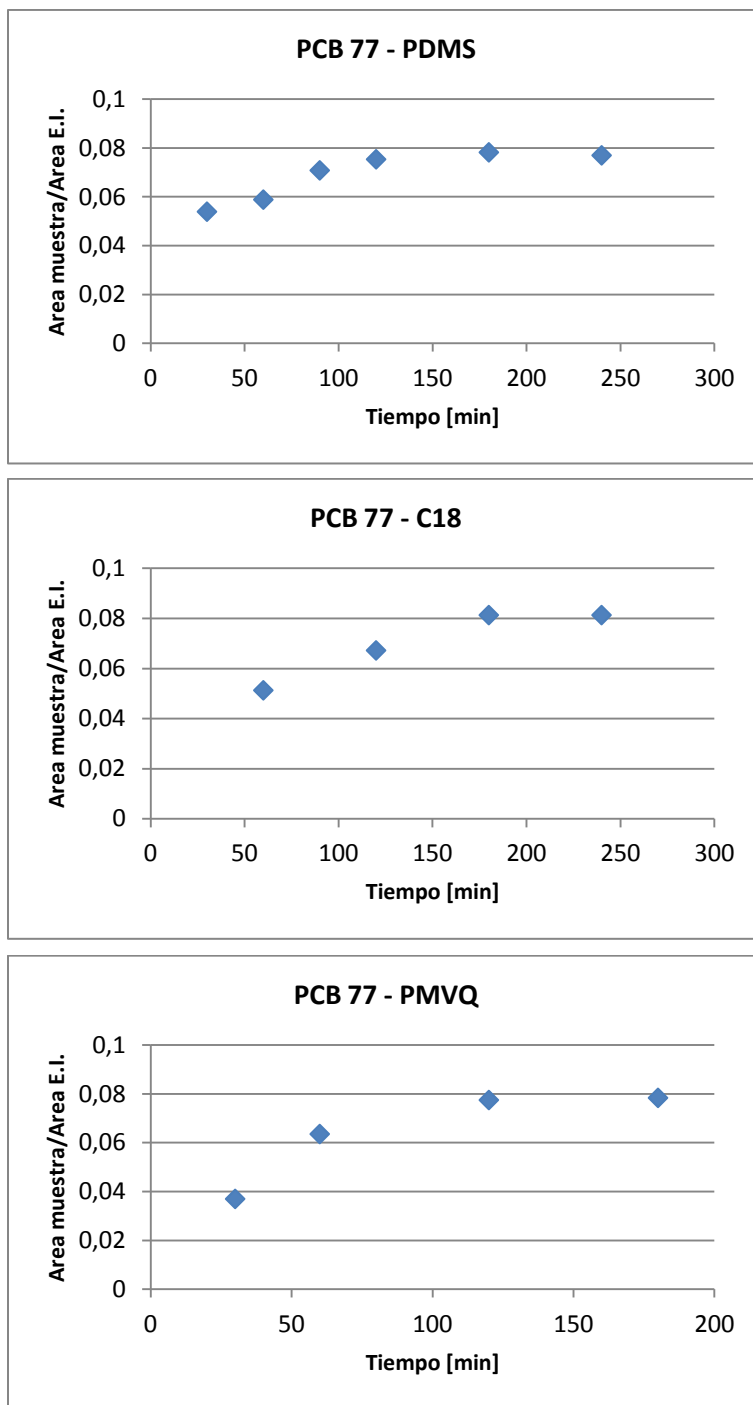


Figura 23.A: Perfiles de extracción para el PCB 77 usando las diversas fases de extracción en 10 mL. de muestra.

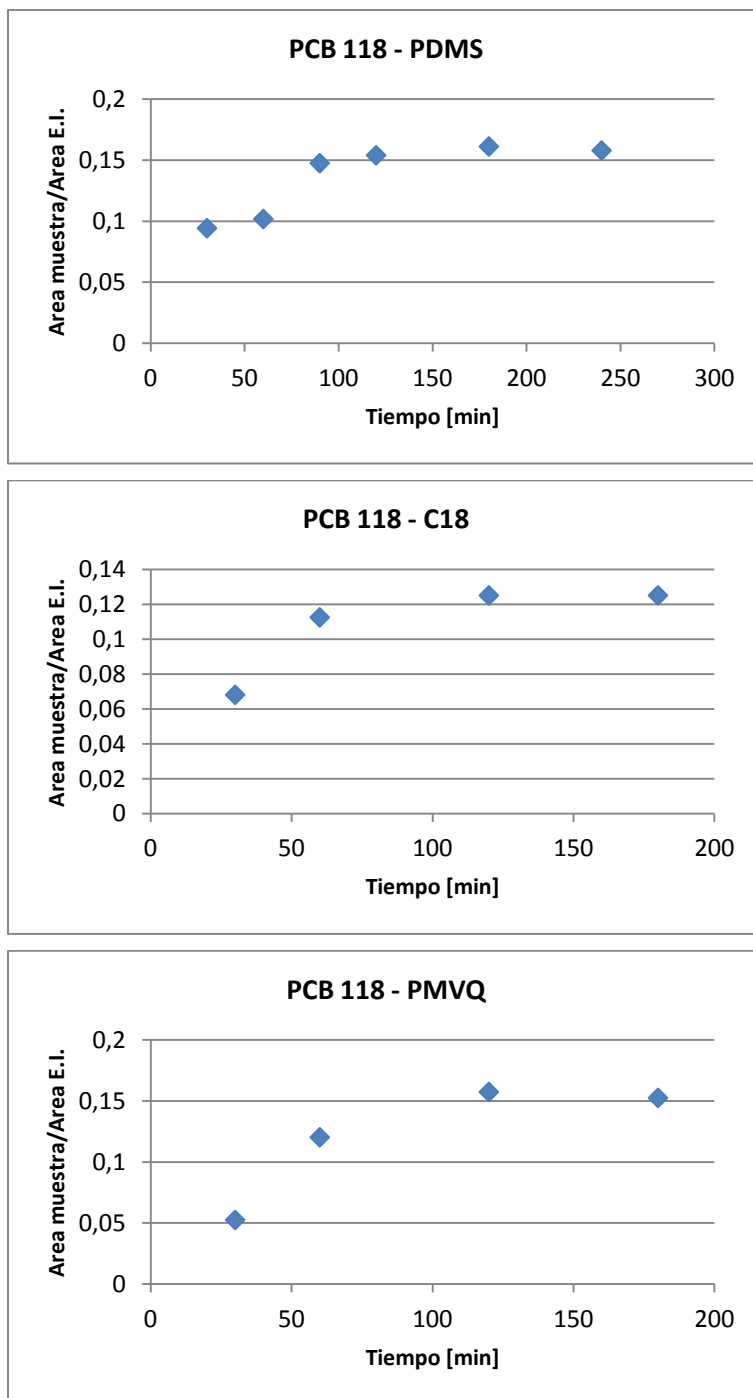


Figura 23.B: Perfiles de extracción para el PCB 118 usando las diversas fases de extracción en 10 mL. de muestra.

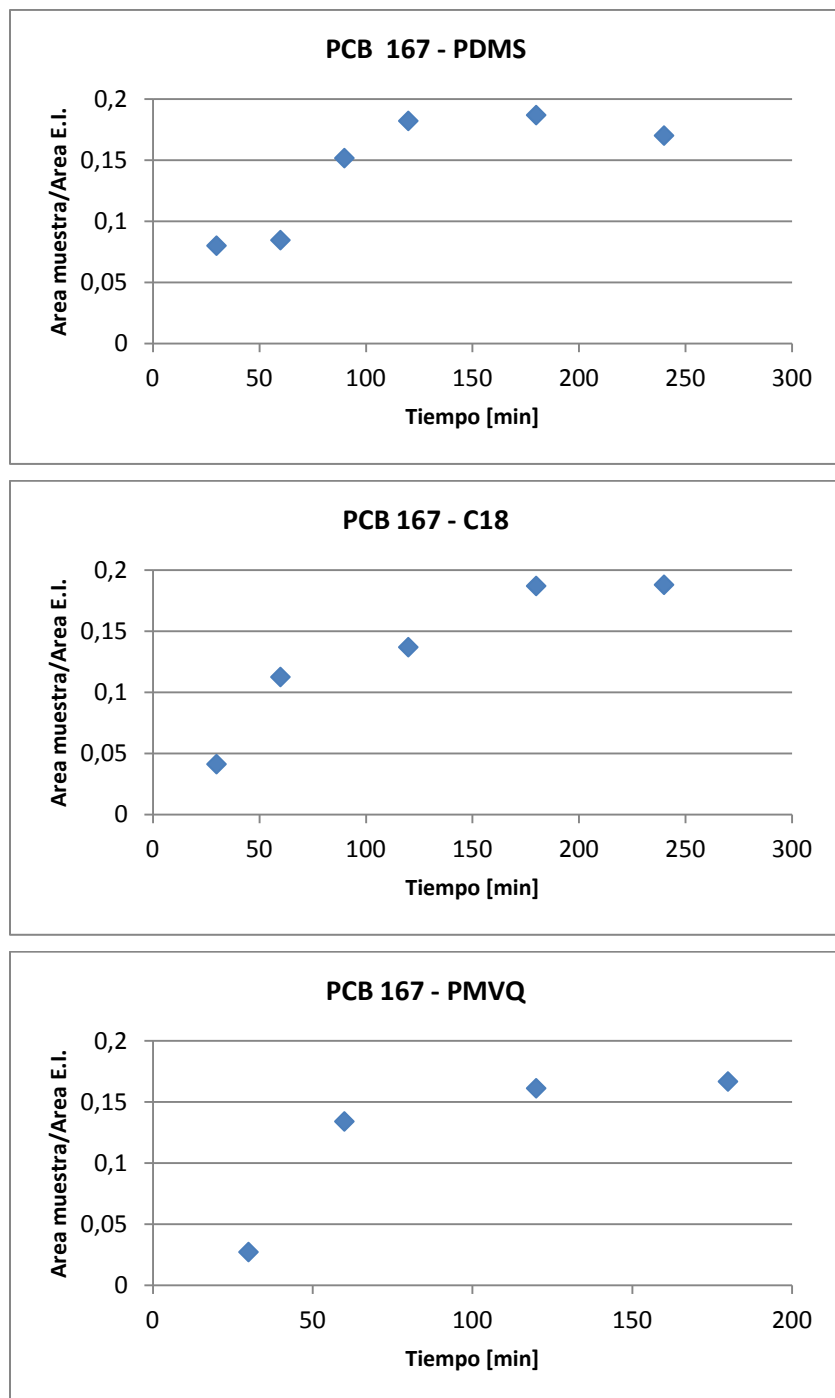


Figura 23.C: Perfiles de extracción para el PCB 167 usando las diversas fases de extracción en 10 mL. de muestra.

Tabla 13: Comparación de los tiempos de extracción en 50 mL y 10 mL de muestra, de las distintas fases adheridas al disco rotatorio (PDMS, C18, MWCNT) y PMVQ a velocidad constante de 1250 rpm.

Fases	Tiempos de equilibrio en los distintos volúmenes.	
	50 mL.	10 mL.
PDMS	160 – 400 min.	100 – 200 min.
C18	60 – 130 min.	50 – 120 min.
MWCNT	60 – 120 min.	50 – 80 min.*
PMVQ	85 – 150 min.	80 – 100 min.

*Configuración 2 de MWCNT.

Tabla 14: Comparación de los porcentajes de recuperación de algunos PCBs para distintas fases a los dos volúmenes distintos de muestra estudiados.

PCBs	Volumen	Fases			
		PDMS	C18	PMVQ	MWCNT
PCB 77	50 mL.	88,3	61,9	95,4	53,5
	10 mL.	88,5	110,3	98,2	63,7*
PCB 114	50 mL.	76,1	64,5	86,9	82,6
	10 mL.	107,3	97,6	97,6	52,8*
PCB 118	50 mL.	79,9	68,7	86,3	78,2
	10 mL.	96,7	70,8	87,2	54,5*
PCB 126	50 mL.	97,3	65,6	81,0	51,6
	10 mL.	100,6	110,3	109,6	73,8*
PCB 157	50 mL.	76,3	61,9	73,1	88,1
	10 mL.	112,2	89,3	94,6	66,4*
PCB 167	50 mL.	73,9	64,5	67,1	79,0
	10 mL.	85,8	83,9	74,4	99,1*
%	50 mL.	81,9	64,5	81,7	72,2
Recuperación Promedio	10 mL.	98,6	93,7	93,5	68,4

*Configuración 2 MWCNT.

Si se comparan las 4 fases estudiadas, para la extracción en 10 mL. de muestra, de acuerdo a la extracción total promedio de PCBs, se obtienen porcentajes de recuperación de $68 \pm 17 \%$, $93 \pm 15 \%$, $94 \pm 12 \%$ y $98 \pm 10 \%$ para MWCNT, C18, PMVQ y PDMS respectivamente.

La precisión de la metodología se determinó considerando las diferentes fases en estudio. En primer lugar, se midió la respuesta entregada por cada fase en el mismo disco ($n=3$) y además, se realizaron mediciones con 9 discos diferentes de forma simultánea para la determinación de la repetibilidad interdisco ($n=9$) obteniéndose los coeficientes de variación que se observan en la Tabla 15.

Tabla 15: Precisión de la metodología utilizando distintas fases para el mismo disco ($n=3$) y distinto disco ($n=9$), expresadas como coeficiente de variación.

	PDMS		C18		PMVQ		MWCNT	
	n=3	n=9	n=3	n=9	n=3	n=9	n=3	n=9
PCB 77	3,8	8,6	3,7	5,5	3,5	6,2	6,4	9,5
PCB 114	8,1	8,9	9,4	14,1	4,1	7,3	4,1	6,2
PCB 118	10,1	10,8	3,3	5,1	3,8	6,8	3,8	5,7
PCB 126	6,7	11,6	2,4	3,9	2,7	4,9	3,3	5,1
PCB 157	9,6	12,7	2,7	4,5	5,4	9,8	2,8	3,4
PCB 167	7,3	9,1	11,1	16,7	8,3	14,8	2,5	4,5

Considerando estos resultados, se puede observar que la mejor fase para la extracción de estos analitos, de acuerdo al tiempo de extracción y al porcentaje de recuperación, es la fase PMVQ.

Para los estudios posteriores se seleccionó la fase de PDMS, fase que presenta el tiempo de extracción mayor (aproximadamente 150 minutos para 10 mL. de muestra) pero recuperaciones totales promedio de 98%, siendo éstas consideradas cuantitativas. Otros puntos que se consideraron para la selección de la fase de trabajo fueron: costos, facilidad en la manipulación y disponibilidad en el laboratorio. Todos los puntos mencionados anteriormente favorecieron la selección de PDMS para continuar con los siguientes estudios.

6.6 - Aplicación de RDSE en muestras reales.

La técnica RDSE se aplicó a la determinación de PCBs en muestras acuosas de agua potable y muestras de los afluentes de las plantas de tratamiento de agua La Farfana y El Trebal.

No se detectaron PCBs en las muestras de agua potable por lo que se decidió enriquecerla a una concentración final en solución de $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los PCBs. Al mismo tiempo se realizó la comparación de los extractos con agua MilliQ, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 24.

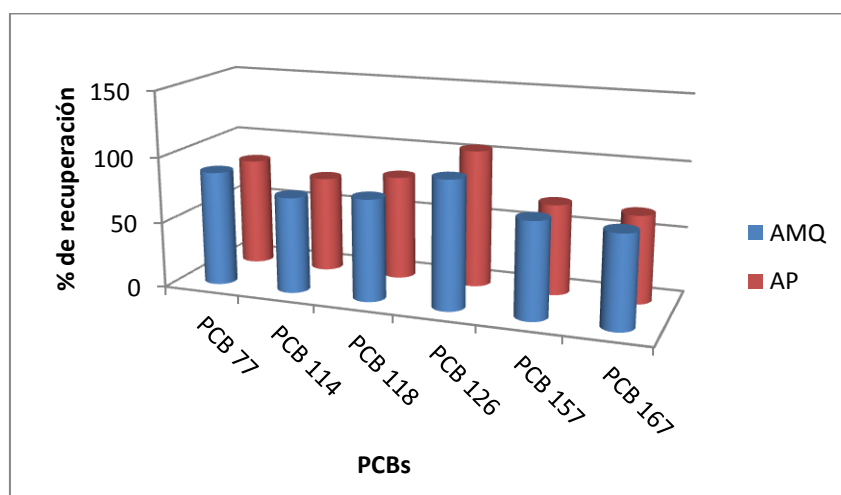


Figura 24: Comparación de las extracciones de PCBs en agua potable y MilliQ ambas enriquecidas a $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a un tiempo de extracción de 200 minutos.

Se puede observar en la Figura 24 que las recuperaciones en ambos tipos de aguas enriquecidas son similares, por lo que el exceso de sales presentes en el agua potable, sobre todo el exceso de cloro disuelto, no interfiere en la extracción, por lo que el tratamiento en los distintos tipos de agua se puede realizar directo, sin tener que realizar una limpieza previa de las aguas.

El mismo tratamiento se hizo a las muestras de los afluentes de las plantas de tratamiento de agua de la región Metropolitana La Farfana y El Trebal, no detectándose estos compuestos como se observa en la Tabla 16.

Tabla 16: Concentración de los PCBs en las muestras de los afluentes de las distintas plantas de tratamiento de agua en la ciudad de Santiago.

		PCBs										
		77	81	105	114	118/123	126	156	157	167	169	189
La Farfana	La Farfana	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
El Trebal	El Trebal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

6.7 - Estudio biodisponibilidad de PCBs en sistemas suelo-biosólido.

6.7.1 - Caracterización del suelo.

En la Tabla 17 se muestran las características generales del suelo y el biosólido seleccionados para la determinación de biodisponibilidad mediante plantas de trigo. Se puede observar que el suelo tiene un pH ligeramente básico y el biosólido es muy cercano a la neutralidad. El suelo presenta una textura franco-limosa, Respecto de la materia orgánica, el suelo presentó menor contenido de esta en comparación a la cantidad contenida en el biosólido (2,5% el suelo y 31,5 % el biosólido).

Tabla 17: Caracterización del suelo y biosólido usado en el estudio de biodisponibilidad.

Análisis	Método	Unidad	Suelo	Biosólido
pH	Suelo:Agua 1:2,5		8,21	6,84
MO	Combustión húmeda y determinación espectrofotométrica del cromato reducido	% Carbono Orgánico	1,42	18,31
CIC	Saturación con NH ₄ OAc 1M a pH 7	cmol·kg ⁻¹	22,3	
Textura	Bouyoucos		Franco Limosa	

6.7.2 - Estudio del tiempo de lixiviación.

Es importante saber el tiempo que se tardan los PCBs en lixiviar desde la matriz de suelo hacia la solución, parámetro que denominaremos *Tiempo de Lixiviación*. Para poder estimarlo se usó, la norma ISO/TS 21268-1 [61] la cual utiliza una solución 0,01 M de CaCl_2 , solución que nosotros modificamos adicionándole un 10% de metanol, para evitar que los PCBs desorbidos se adsorban en las paredes del vial de extracción, y posteriormente el lixiviado fue tratado mediante RDSE. Obteniéndose los perfiles de tiempo de lixiviación que se muestran en la Figura 25.

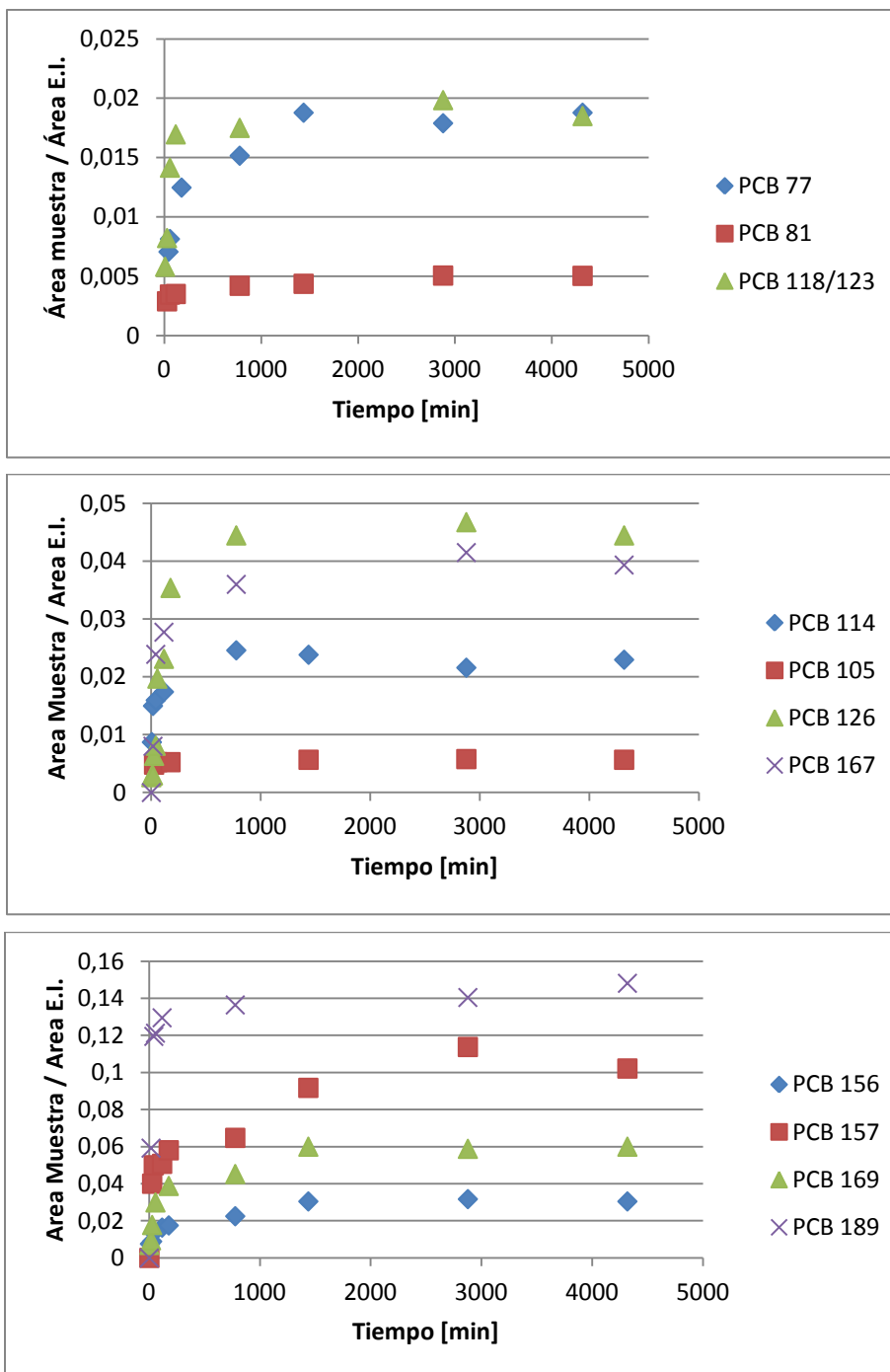


Figura 25: Perfiles de Tiempo de lixiviación de los distintos PCBs mediante el uso de la metodología de extracción basado en la norma ISO/TS 21268-1 y su posterior extracción mediante RDSE.

De acuerdo a los perfiles de lixiviación que se muestran en la Figura 25, se decidió trabajar a tiempos de agitación sobre los 2000 minutos, tiempo en el cual la lixiviación es constante para cada uno de los PCBs en estudio. Teniendo definido el tiempo de trabajo, éste se aplicó a las extracciones de las muestras de suelo a diferentes dosis de biosólido para después ser tratadas mediante RDSE con PDMS como fase extractante. Se obtuvieron las concentraciones de PCBs que se muestran en la Figura 26. Como se esperaba se puede observar que al ir aumentando la dosis de biosólido aplicado al suelo, la concentración de PCBs lixiviados también aumenta, ya que los PCBs se encuentran en el biosólido.

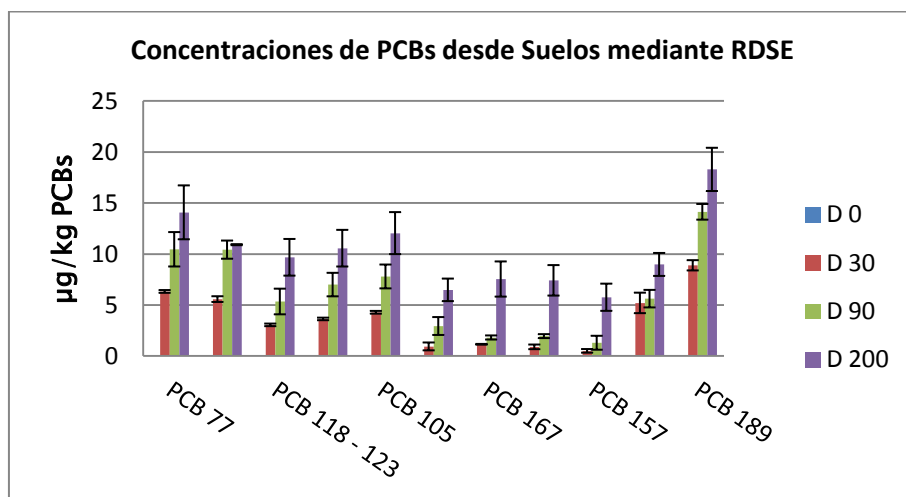


Figura 26: Concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de los PCBs obtenidos mediante RDSE en lixiviados de suelos.

Si esta respuesta es normalizada, determinándose el porcentaje de PCBs que realmente fue lixiviado con respecto del total presente en las diversas mezclas de suelo con biosólidos, se obtiene el comportamiento que se observa en Figura 27. Esto se debe al efecto de la materia orgánica presente, ya que a la menor dosis de biosólido, las interacciones analito-matriz disminuyen ya que se agrega una menor cantidad de MO, quedando los PCBs más disponibles para ser lixiviados, en cambio a las dosis mayores de biosólido, cuando se agrega una mayor cantidad de MO, estas interacciones son mayores, quedando los compuestos más retenidos, haciendo que los PCBs sean menos lixiviables y por lo tanto menos biodisponibles.

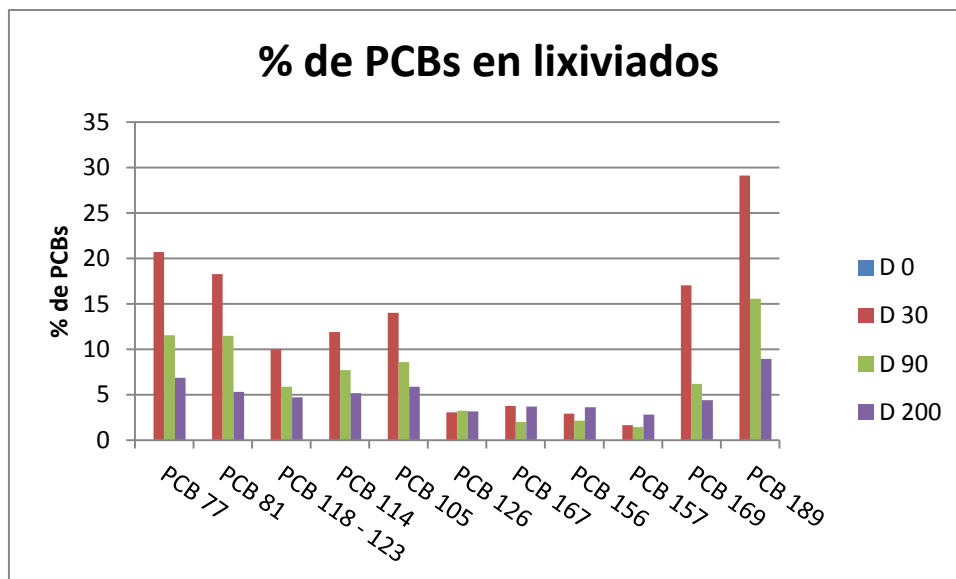


Figura 27: Extracción de PCBs desde los lixiviados de las distintas mezclas suelo-biosólidos mediante RDSE.

Las diferencias de concentraciones obtenidas mediante la lixiviación de estos analitos, se debe principalmente a las diferencias de solubilidades de los PCBs en estudio, ya que al ir aumentando en cantidad de átomos de cloro su solubilidad en agua va disminuyendo como se puede observar en el anexo 1. En la Figura 27, se observa que, en los PCBs 77 al 123 y los PCBs 169 y 189, el grado de lixiviación disminuye a medida que aumenta la dosis de biosólido agregado al suelo. Esta disminución en la lixiviación se debería a las interacciones de los analitos con la materia orgánica incorporada al suelo a través del biosólido. Por otra parte se encontró que los PCBs 126, 167, 156 y 157, no mostraron el mismo comportamiento, posiblemente debido a la baja concentración encontrada. Además se pudo observar que el congénere de mayor tamaño fue el que experimentó la mayor lixiviación respecto de los demás compuestos, en las tres dosis, lo cual podría deberse a su mayor tamaño, que influiría en su solubilidad, ya que experimentaría una mayor dificultad de retención del compuesto en el suelo tratado con las distintas dosis de biosólido. Debido a que la cantidad de PCBs determinado es muy pequeña, (menor al 5% de la cantidad de PCBs existente en el sistema suelo-biosólido) es que se producen los errores en la medición que se observan en los PCB 126, 167, 156 y 157, los cuales se consideran dentro de los experimentales.

6.7.3 - Estudio con plantas de Trigo

6.7.3.1 - Extracción desde las muestras plantas

La extracción de los analitos desde las plantas se llevó a cabo usando extracción con ultrasonido basándose en el método EPA 3550C [63], el cual recomienda que para la extracción de PCBs se debe usar como solventes una mezcla hexano-acetona: 1:1.

Como los extractos de plantas presentan gran cantidad de clorofila disuelta en el solvente de extracción, se debe realizar una etapa de limpieza la cual se basó en el método EPA 3665A [64], para luego ser concentradas bajo flujo de nitrógeno a 1 mL. y posterior almacenamiento a 4 °C hasta su análisis final mediante GC-ECD (MS).

6.7.3.2 - Limpieza de las muestras o “Clean-up”.

Para la limpieza de los extractos de plantas, como se mencionó en el párrafo anterior, se utilizó ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ 95 - 97 %), basándose en el método EPA 3665A, en la Figura 28 se puede observar como es la muestra antes y después del proceso de limpieza, pasando de un color verde característico de extractos vegetales, y quedando finalmente un extracto limpio (transparente) apropiado para ser medido a través de cromatografía de gases. Esta metodología previamente fue evaluada con soluciones de estándares de cada uno de los analitos a una concentración de de 5 µg·L⁻¹ disueltos en hexano, obteniéndose recuperaciones que van desde un 84% hasta un 106% dependiendo de cada PCBs como se puede observar en la Tabla 18.

Tabla 18: Recuperaciones de los distintos PCBs después de la etapa de “clean-up”.

	PCB										
	77	81	118/123	114	105	126	167	156	157	169	189
Promedio	4,8	4,3	4,4	4,5	4,2	5,3	4,9	4,7	4,7	4,4	4,4
SD	0,5	0,2	0,3	0,1	0,2	0,6	0,1	0,2	0,5	0,3	0,3
%recup	96	86	88	90	84	106	98	94	94	88	88

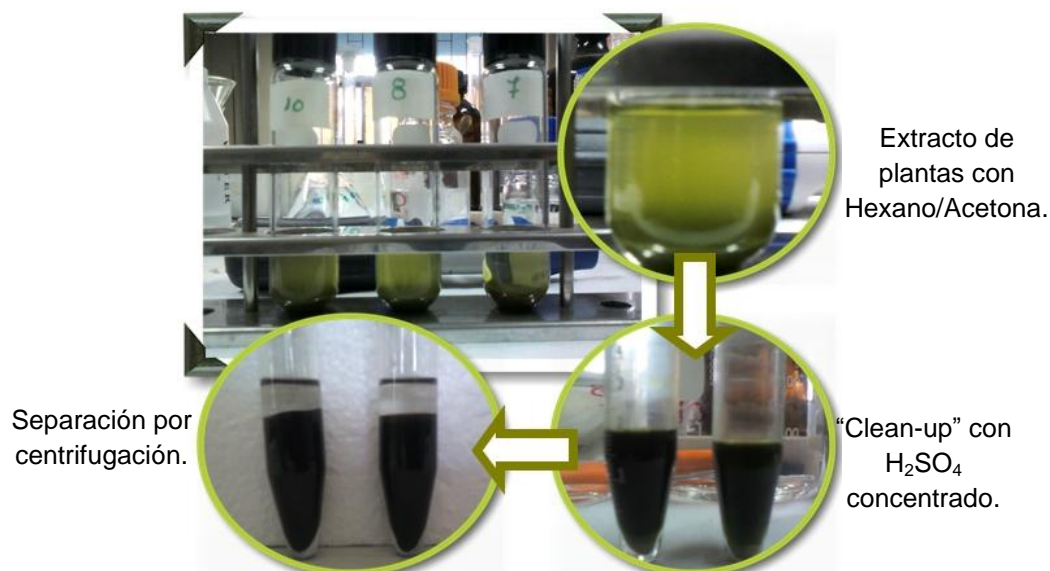


Figura 28: Limpieza de los extractos de plantas mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado (método EPA3665A).

Por lo que se decidió usar este método de limpieza para las muestras de plantas de trigo, tanto para las extracciones de la parte aérea (hojas) como de la raíz.

En la Figura 29 se muestra un cromatograma del extracto de raíz de trigo de una planta que fue cultivada en suelo enmendado con 200 Mg·Ha⁻¹ de biosólido enriquecido con PCBs.

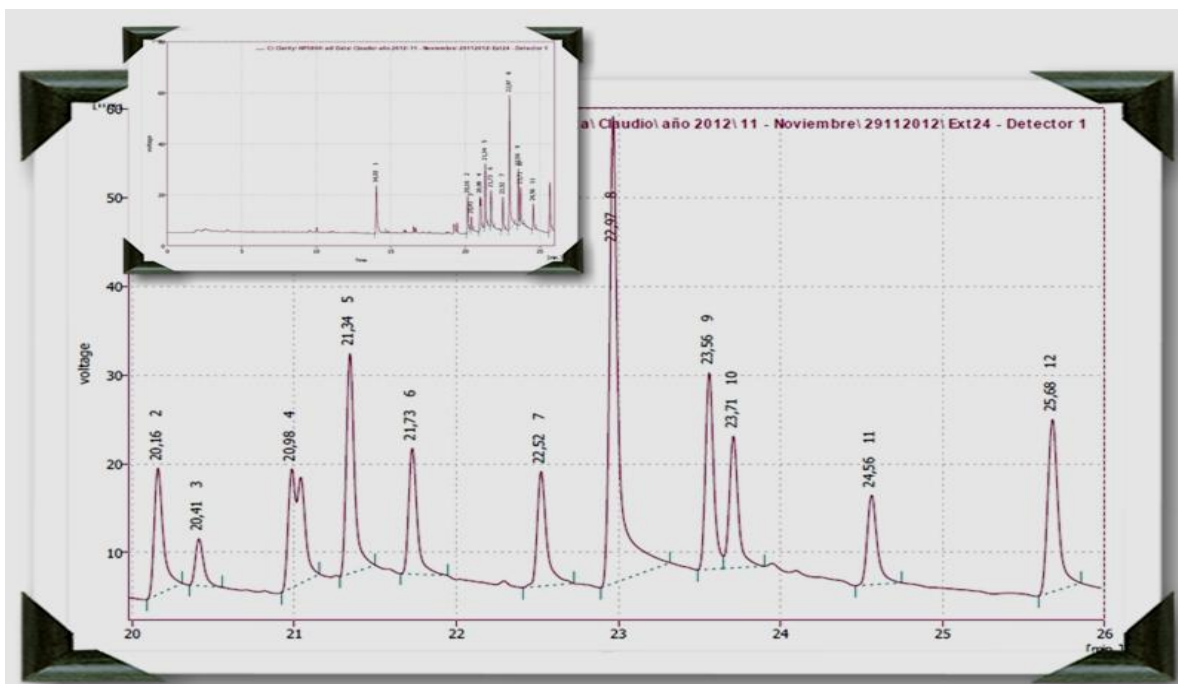


Figura 29: Cromatograma del extracto de una muestra de raíz de trigo en suelo enmendado a $200 \text{ Mg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

En la Figura 30, se observa que al ir aumentando la dosis de biosólido aplicado al suelo, la cantidad de PCBs encontrado en la raíz de la planta de trigo es mayor, esto se debe a que el contaminante se encuentra en el biosólido, por lo que al aumentar su dosis en la enmienda, también aumenta la cantidad de PCBs presente en la mezcla suelo-biosólido y que se encuentra biodisponible para ser asimilado por las raíces de la planta de trigo.

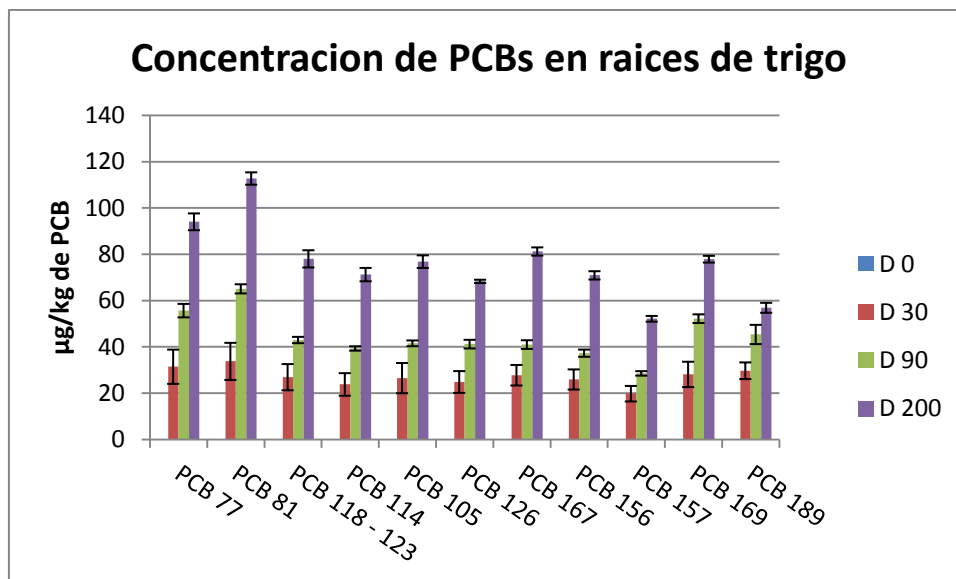


Figura 30: Concentración $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de los diversos PCBs en raíz de las plantas de trigo, cultivadas en el suelo Taqueral enmendado con 0, 30, 90 y 200 $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de biosólido.

Si realizamos el mismo tratamiento anterior y determinamos la cantidad relativa de PCBs absorbido por la planta (fracción biodisponible), obtenemos el gráfico de la Figura 31, donde se puede observar que a la menor dosis de enmienda la cantidad de PCBs biodisponible es mayor, esto se debe a que existe una menor cantidad de materia orgánica presente en el sistema, por lo que las interacciones analito matriz no son tan fuertes, por lo que los compuestos se encuentran más disponibles para ser asimilados por la planta. Contrariamente en la dosis 200, la cantidad de PCBs biodisponible para las plantas es menor, ya que estos compuestos al ser lipofílicos, tienden a unirse a la materia orgánica por lo que se encontrarían menos biodisponibles para ser asimilados por las raíces de las plantas.

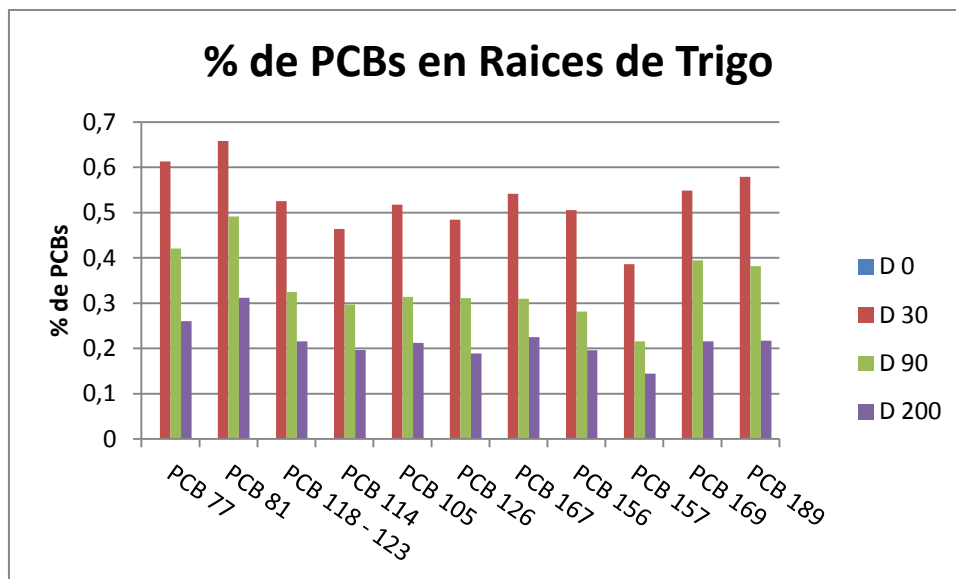


Figura 31: % PCBs sorbidos por las raíces de las plantas de trigo.

6.8 - Comparación de las concentraciones obtenidas por los dos métodos para la determinación de biodisponibilidad de PCBs en suelos y plantas.

Se correlacionó las cantidades de PCBs obtenidos mediante la lixiviación y posterior extracción con RDSE versus la cantidad de los analitos asimilada por las raíces de las plantas de trigo. Para esto se usó una correlación simple para cada uno de los PCBs obteniéndose los valores que se muestran a continuación en la Tabla 19.

Tabla 19: Correlación entre los porcentajes de absorción obtenidos mediante planta de trigo y RDSE.

Correlación de PCBs entre raíz de trigo y RDSE.				
	Ecuación	Coefficiente de correlación	P-Value	
PCB 77	$Y = 33,0723 \cdot X - 0,922259$	0,987928	0,0121	**
PCB 81	$Y = 27,3381 \cdot X - 1,22411$	0,97795	0,0221	**
PCB 105	$Y = 27,0992 \cdot X + 0,0518486$	0,999949	0,0001	**
PCB 114	$Y = 25,6244 \cdot X + 0,0498852$	0,999926	0,0001	**
PCB 118/123	$Y = 18,6747 \cdot X + 0,171939$	0,995802	0,0042	**
PCB 126	$Y = 6,07212 \cdot X + 0,868456$	0,785788	0,2142	**
PCB 156	$Y = 4,97112 \cdot X + 0,948099$	0,664406	0,3356	**
PCB 157	$Y = 3,24098 \cdot X + 0,86588$	0,450848	0,5492	**
PCB 167	$Y = 6,2395 \cdot X + 0,677354$	0,791018	0,2090	**
PCB 169	$Y = 23,2193 \cdot X - 0,643328$	0,955678	0,0443	**
PCB 189	$Y = 49,0354 \cdot X + 0,177548$	0,996219	0,0038	**

** : Relación estadísticamente significativa al 95%.

Valor de P-Value menor que 0,05 la relación es estadísticamente significativo.

X = µg PCBs en las raíces de las plantas; Y = µg PCBs en el lixiviado.

Los P-Value que se observan en la Tabla 19, en su mayoría son menores que 0,05 lo que nos indica que las correlaciones obtenidas entre RDSE en los lixiviados y las raíces de las plantas de trigo son estadísticamente significativas para un nivel de confianza de 95%.

Los valores de p-value de los PCBs 126, 156, 157 y 167, son mayores que 0,5 por lo que las correlaciones obtenidas no son estadísticamente significativas, esto se debe a la baja cantidad de PCBs que se lixivió por lo que el error que se puede cometer en la determinación y posterior cuantificación es bastante grande, y pueden ser considerados dentro de los valores de error experimental.

Capítulo V

Conclusiones

VII. Conclusiones

Se demostró en este trabajo que los PCBs pueden ser extraídos y preconcentrados desde matrices acuosas a través de un dispositivo de disco rotatorio (RDSE) con diversas fases sorbentes apolares inmovilizadas en su superficie, produciéndose la extracción más rápida en la fase que presente una mayor área superficial efectiva. De esta forma, la fase que extrajo los PCBs desde matrices acuosas en un menor tiempo fue la fase de C18, con un tiempo de extracción promedio de 75 minutos. La fase más eficiente para la extracción/preconcentración de PCBs fue la fase PMVQ con recuperaciones sobre 80% y tiempos promedio de extracción de 100 minutos.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos para la determinación de PCBs estuvieron entre $0,01 - 0,16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,04 - 0,52 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. La exactitud fue evaluada con pruebas de recuperación, obteniéndose valores de 98%, 93%, 94%, 68% para las fases PDMS, C18, PMVQ y MWCNT respectivamente. Con respecto a la precisión ésta se expresó como coeficiente de variación, obteniéndose valores que van desde 3,8% – 10,1% para PDMS, 2,4%– 11,1% para C18, 2,7% – 8,3% para PMVQ y 2,5% – 6,4% para MWCNT.

Por otra parte, en esta tesis se demostró que la extracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) en conjunto con un proceso previo de lixiviación en agua (norma ISO/TS 21268-1) puede utilizarse como metodología biosimuladora para estimar la biodisponibilidad de PCBs en muestras de suelo enmendadas con biosólido. De esta forma, se observó que a mayor contenido de materia orgánica (mayor cantidad de biosólido agregado) menor fue la lixiviación de PCBs, lo cual conlleva una disminución de la biodisponibilidad de estos compuestos morigerando el efecto tóxico en el medio ambiente. Las concentraciones de los PCBs absorbidos por las raíces de plantas de trigo correlacionaron con las concentraciones de PCBs obtenidas mediante RDSE para todos los PCBs, siendo estadísticamente significativas para un nivel de confianza de 95%.

El método propuesto mediante el uso de RDSE con una lámina de PDMS fue adecuado para la determinación de la biodisponibilidad de bifenilos policlorados (PCBs) en este tipo de suelo agrícola cuando se usa plantas de trigo como bioindicador.

Capítulo VI

Referencias

VII. REFERENCIAS

- [1] Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J., Gallardo, S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process biochemistry* 40 (2005) 1999.
- [2] Mandalakis, M. Holmstrand, H. Anderson, P. Gustafsson, Ö. Compound –specific chlorine isotope analysis of polychlorinated biphenyls isolated from Aroclor and Clophen technical mixtures. *Chemosphere* 71 (2008) 299.
- [3] Turrio-Baldasarri, L. Abballe, A. Casella M. di Domenico, A. Iacovella, N. La Rocca, C. Analysis of 60 PCBs congeners in drinkable water samples at 10 – 50 pg/L level. *Microchemical journal* 79 (2005) 193.
- [4] Donald Mackay, Wan Ying Shiu, Kuo-Ching Ma, Sum Chi Lee, *Handbook of Physical-Chemical properties and Environmental Fate For Organic Chemicals Volume II, Second Edition*, CRC, Taylor and Francis Group.
- [5] Harrison, E.Z., Oakes, S.R., Hyseel, M., Hay, A., Organic chemicals in sewage sludges. *The Science of the Total Environment* 367 (2006) 481.
- [6] Singh, R.P., Agrawal, M., Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste management* 28 (2008) 347.
- [7] Wang, X., Chen, T., Ge, Y., Jia, Y., Studies of land application of sewage sludge and its limiting factors. *Journal of hazardous materials* 160 (2008) 554.
- [8] Quan-Ying Cai, Ce-Hui Mo, Qi-Tang Wu, Qiao-yun Seng, Athanasios Katsoyiannis, Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere* 68 (2007) 1751.
- [9] Eljarrat, E., Caixach, J., Rivera, J., Effects of sewage eludges contaminated with polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on agricultural soils. *Environmental science & technology* 31 (1997) 2765.

- [10] Batterman, S., Chernyak, S., Gouden, Y., Hayes, J., Robins, T., Chetty, S., PCBs in air, soil and milk in industrialized and urban areas of KwaZulu-Natal, South Africa. *Environmental pollution* 157 (2009) 654.
- [11] CONAMA, Manual de Chile para el manejo de bifenilos policlorados (PCBs; Askareles) Un estudio de casos sobre la aplicación de aguas. Gobierno de Chile.
- [12] Perez, Catalina, Extraccion de bifenilos policlorados (PCBs) en matrices liquidas a travez de un nuevo sistema de dsco rotatorio con superficie de polidimetilsiloxano. Tesis para optar al título de Químico ambiental, Universidad de Chile. 2010
- [13] CONAMA, Inventario nacional de PCBs de otros usos. 2008. Gobierno de Chile
- [14] Semple, K., Doick, K., Jones, K., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., Defining Bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* 38 (2004) 228A
- [15] Sethajintanin, D., Anderson, K.A., Temporal bioavailability of organochlorine pesticides and PCBs. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 3689
- [16] Martin, A., Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 39 (2000) 4259
- [17] Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., The bioavailabilityof chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57 (2004) 39
- [18] Brack, W., Bandow,N., Schwab, K., Schulze, T., Streck, G., Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 543 – 549
- [19] Luque-Garcia, J.L., Luque de Castro, M.D., Ultrasound: a powerfull tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 565 – 574
-

- [20] Deveau, P., Mallet, V., Analysis of polychlorinated biphenyls and DDT and related isomers in complex samples using a small volume of organic solvent in back extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 75 (1999) 331
- [21] Vreuls, R.J.J., Romijn, E., Brinkman, U.A.T. In-vial liquid-liquid extraction with subsequent large-volume on-column injection into GC-MS for the determination of anilines in tap, surface, and wastewater. *Journal of Microcolumn Separations* 10 (1998) 581
- [22] Catalina, M.I., Dalluge, J., Vreuls, R.J.J., Brinkman, U.A.T. Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid-liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 877 (2000) 153
- [23] Hauser, B., Popp, P., Kleine-Benne, E. Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 27
- [24] Psillakis, E., Kalogerakis, N. Developments in single-drop microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 53
- [25] Jönsson J.Å., Mathiasson, L. Membrane extraction in analytical chemistry. *Journal of Separation Science* 24 (2001) 495
- [26] Belardi, R.P., Pawliszyn, J.B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of the organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canada* 24 (1989) 179
- [27] Pawliszyn J (ed) (1999) Applications of solid-phase microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
-

- [28] Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C. Stir bar sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737
- [29] Montero, L., Popp, P., Paschke, A., Pawliszyn, J. Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1025 (2004) 17
- [30] Bruheim, I., Liu, X., Pawliszyn, J. Thin-film microextraction. *Analytical Chemistry* 75 (2003) 1002
- [31] Qin, Z., Bragg, L., Ouyang, G., Pawliszyn, J. Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. *Journal of Chromatography A* 1196 – 1197 (2008) 89
- [32] P. Sandra, E. Baltussen, F. David, A. Hoffman, Global Analytical Solutions, Gerstel, AppNote 2/2000.
- [33] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, S. Nakamura, S. Global Analytical Solutions, Gerstel, AppNote 12/2006.
- [34] Sporning, S., Bowadt, S., Svensmark, B., Björklund, E. Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A* 1090 (2005) 1
- [35] Nakamura, S., Daishima, S. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038 (2004) 291
-

- [36] Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Nakazawa, H. Determination of 4-nonylphenol and 4-ter.-octylphenol in water samples by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 505 (2004) 217
- [37] Popp, P., Bauer, C., Wennrich, L. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 1
- [38] Giordano, Ady. Desarrollo de una estrategia de extracción en fase solida de pesticidas desde matrices acuosas, utilizando un sistema de disco rotatorio. Tesis para la obtención del grado de Doctor en Química de la Universidad de Chile (2010)
- [39] Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepulveda, B. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 8598
- [40] Northcott G.L., Jones, K.C. Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 1. compound differences in aging and sequestration. *Environmental Science & Technology* 35 (2001) 1103
- [41] Jonker M.T.O, Hawthorne, S.B., Koelmans, A.A. Extremely slowly desorbing polycyclic aromatic hydrocarbons from soot and soot-like materials: Evidence by supercritical fluid extraction. *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 7889
- [42] Cornelissen, G., Van Noort, P.C.M., Parsons, J.R., Govers, H.A.J. Temperature dependence of slow adsorption and desorption kinetics of organic compounds in sediments. *Environmental Science & Technology* 31 (1997) 454
- [43] Hulscher, TH., Vrind, B.A., Van den Heuvel, H., Van der Velde, L.E., Van Noort, P.C.M., Beurskens, J.E.M., Govers, H.A.J. Triphasic desorption of highly resistant chlorobenzenes, polychlorinated biphenyls, and polycyclic aromatic hydrocarbons

- in field contaminated sediment. *Environmental Science & Technology* 33 (1999) 126
- [44] Van der Wal, L., Van Gestel, C.A.M., Hermens, J.L.M. Solid phase microextraction as a tool to predict internal concentrations of soil contaminants in terrestrial organisms after exposure to a laboratory standar soil. *Chemosphere* 54 (2004) 561
- [45] Reid, B.J., Jones, K.J., Semple, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution* 108 (2000) 103
- [46] Brack, W., Bandow, N., Schwab, K., Schulze, T., Streck, G. Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 543
- [47] Tao, S., Guo, L.Q., Wang, X.J., Liu, W.X., Ju, T.Z., Dawson, R., Cao, J., Xu, F.L., LI, B.G. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *The Science of the Total Environment* 320 (2004) 1
- [48] Liste, H., Alexander, M. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere* 46 (2002) 1011
- [49] Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 31 (1997) 214
- [50] Hawthorne, S.B., Poppendieck, D.G., Grabanski, C.B., Loehr, R.C., Comparing PAH availability from manufactures gas plant soils and sediments with chemical and biological test. 1. PAH release during water desorption and supercritical carbon dioxide extraction. *Environmental Science & Technology* 36 (2002) 4795

- [51] Latawiec, A.E., Swindell, A.L., Ried, B.J. Environmentally friendly assessment of organic compound bioaccessibility using sub-critical water. *Environmental Pollution* 156 (2008) 467
- [52] Tao, S., Xu, F., Liu, W., Cui, Y., Coveney R.M. Mimicking bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to wheat grown in soils containing various amounts of organic matter. *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 2219
- [53] Tao, S., Guo, L.Q., Wang, X.J., Liu, W.X., Ju, T.Z., Dawson, R., Cao, J., Xu, F.L., Li, B.G. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *The Science of the Total Environment* 320 (2004) 1
- [54] Voparil, I.M., Burgess, R.M. Mayer, L.M., Tien, R., Cantwell, M.G., Ryba, S.A. Digestive bioavailability to a deposit feeder (*Arenicola marina*) of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with anthropogenic particles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (2004) 2618
- [55] Tang, J., Robertson, B., Alexander, M. Chemical-extraction methods to estimate bioavailability of DDT, DDE, and DDD in soil. *Environmental Science & Technology* 33 (1999) 4346
- [56] Krauss, M., Wilcke, W. Biomimetic extraction of PAHs and PCBs from soil with octadecyl-modified silica disk to predict their availability to earthworms. *Environmental Science & Technology* 35 (2001) 3931
- [57] Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M., Van Noort, P. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science & Technology* 32 (1998) 966
- [58] Berkner, S., Streek, G., Herrmann, R. Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* 54 (2004) 575
-

- [59] Mayer, P., Vaes, W., Wijnker, F., Legierse, K., Kraaij, R., Tolls, J., Hermens, J. Sensing dissolved sediment porewater concentration of persistent and bioaccumulative pollutants using disposable solid-phase microextraction fiber. *Environmental Science & Technology* 34 (2000) 5177
- [60] Van der Wall, L., Jager, T., Fleuren, R., Barendregt, A., Sinnige, T., Van Gestel, C., Hermens, J., Solid-phase microextraction to predict bioavailability and accumulation of organic micropollutants in terrestrial organisms after exposure to a field-contaminated soil. *Environmental Science & Technology* 38 (2004) 4842
- [61] Soil quality-leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soils and soil materials. ISO/TS 21268-1. 2007.
- [62] Sadzawka, A., Carrasco, M.A., Grez, R., Mora, M.D.L.L., Flores, H., Neaman, A. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Serie Actas INIA N°34, Santiago, Chile
- [63] Houba, V., Temminghoff, E., Gaikhorst, G., and Van Vark, W. Soil analysis procedures using 0,01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in soil science plant analysis* 31 (2000) 1299.
- [64] EPA Method 3550C, Ultrasonic extraction, Revision 3, February 2007
- [65] EPA Method 3665A Sulfuric acid/permanganate cleanup, Revision 1, December 1996
- [66] Fürst, P., Bernsmann, T., Baumeister, D. Determination of dioxin-like and non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners in foodstuffs and animal feed using the agilent 7000 triple quadrupole GC/MS Application Note, Food Safety Agilent Technologies
- [67] Analyse This, International laboratories, http://www.tlr.nl/sites/default/files/2012%20Factsheet%20Dioxins%20and%20dioxin-like%20PCBs_1.pdf
-

- [68] Prieto, A., Telleria, O., Etxebarria, N., Fernández, L.A., Usobiaga, A., Zuloaga, O., Simultaneous preconcentration of a wide variety organic pollutants in water samples. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction. *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 1.
- [69] Prieto, A., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Etxebarria, N., Fernandez, L.A. Development of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography –mass spectrometry method for the simultaneous determination of several persistent organic pollutant in water samples. *Journal of Chromatography A* 1174 (2007) 40.
- [70] Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernandez, L.A., Etxebarria, N., Zuloaga, O., Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimization, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2642
- [71] Zuin, V.G., Montero, L., Bauer, C., Poop, P. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate tea. *Journal of Chromatography A* 1091 (2005) 2
- [72] Quintana, J.B., Rodil, R., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1174 (2007) 27
- [73] Giordano, A., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J., Font, G., Picó, Y. Pesticide residue determination in surface waters by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393 (2009) 1733.
- [74] Paschke, A., Brümmer, J., Schüürmann, G. Silicone rod extraction of pharmaceuticals from water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 1417
-

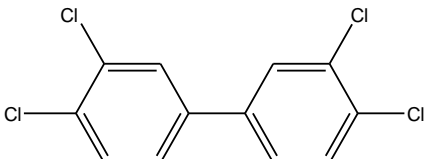
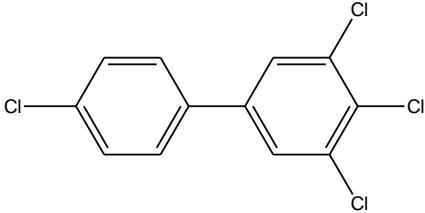
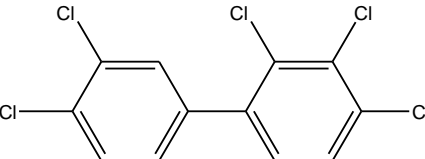
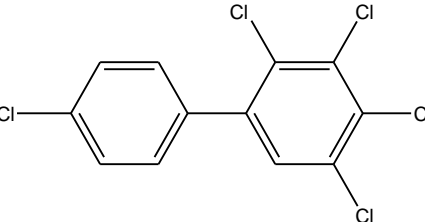
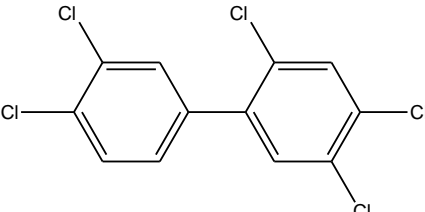
- [75] Pinxteren, M., Paschke, A., Popp, P., Silicone Rod and silicone tube sorptive extraction. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2589

Capítulo VII

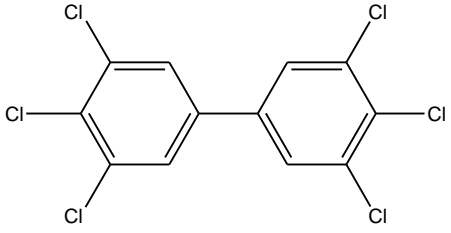
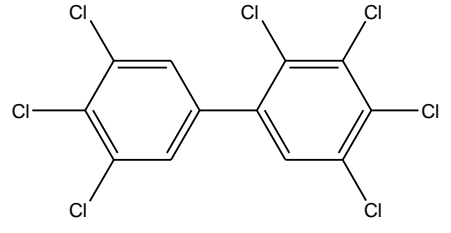
Anexos

Anexo 1

Propiedades físicas y químicas de las moléculas de PCBs

	MOLECULA	
PCB 77		F.M. = $C_{12}H_6Cl_4$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 291,988 V.M. = 268,2 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,175 Log K_{OW} = 6,04 Log K_{OC} = 5,75
PCB 81		F.M. = $C_{12}H_6Cl_4$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 291,988 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0929 Log K_{OW} = 5,96 Log K_{OC} = 5,76
PCB 105		F.M. = $C_{12}H_5Cl_5$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 326,433 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0405 Log K_{OW} = 6,41 Log K_{OC} = 6,09
PCB 114		F.M. = $C_{12}H_5Cl_5$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 326,433 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0121 Log K_{OW} = 6,29 Log K_{OC} = 6,09
PCB 118		F.M. = $C_{12}H_5Cl_5$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 326,433 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,01344 Log K_{OW} = 7,42 Log K_{OC} = 6,16

PCB 123		<p>F.M. = $C_{12}H_5Cl_5$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 326,433 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,00201 Log K_{OW} = 6,63 Log K_{OC} = 6,16</p>
PCB 126		<p>F.M. = $C_{12}H_4Cl_6$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 360,878 V.M. = 310,0 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,00533 Log K_{OW} = 7,13 Log K_{OC} = 6,51</p>
PCB 126		<p>F.M. = $C_{12}H_5Cl_5$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 326,433 V.M. = 289,1 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0321 Log K_{OW} = 6,38 Log K_{OC} = 6,18</p>
PCB 156		<p>F.M. = $C_{12}H_4Cl_6$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 360,878 V.M. = 310,0 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,00533 Log K_{OW} = 7,13 Log K_{OC} = 6,51</p>
PCB 157		<p>F.M. = $C_{12}H_4Cl_6$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 360,878 V.M. = 310,0 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0152 Log K_{OW} = 7,18 Log K_{OC} = 6,51</p>
PCB 167		<p>F.M. = $C_{12}H_4Cl_6$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 360,878 V.M. = 310,0 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0128 Log K_{OW} = 7,29 Log K_{OC} = 6,58</p>

PCB 169		F.M. = $C_{12}H_4Cl_6$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 360,878 V.M. = 310,0 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,000522 Log K_{OW} = 7,54 Log K_{OC} = 6,60
PCB 189		F.M. = $C_{12}H_3Cl_7$ M.M. [$g \cdot mol^{-1}$] = 395,323 V.M. = 330,9 Solubilidad [$mg \cdot L^{-1}$] = 0,0063 Log K_{OW} = 7,14 Log K_{OC} = 6,94

Anexo 2

Imagen de un cromatograma completo incluido el estándar interno

