

UCH-FC  
Q. Ambiental  
S638  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“BIODISPONIBILIDAD DE NONILFENOL EN TRIGO Y SU PREDICCIÓN  
MEDIANTE MÉTODO BIOMIMETICO CON SOLVENTES PRESURIZADOS Y  
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A  
DETECTOR DE MASAS”**

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

**Químico Ambiental**



**Carlos Esteban Smelt Tarsetti**

Directores de Seminario de Título: M. Cs. Inés Ahumada Torres y Dr. Pablo Richter Duk.

Profesora Patrocinante: M. Cs. Sylvia V. Copaja

Enero de 2010

Santiago - Chile



**ESCUELA DE PREGRADO-FACULTAD DE CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

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



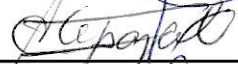


**CARLOS ESTEBAN SMELT TARSETTI**


**“BIODISPONIBILIDAD DE NONILFENOL EN TRIGO Y SU PREDICCIÓN  
MEDIANTE MÉTODO BIOMIMETICO CON SOLVENTES PRESURIZADOS Y  
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRFIA GASEOSA ACOPLADA A  
DETECTOR DE MASAS”**

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

**COMISIÓN DE EVALUACIÓN**

- Mcs. Inés Ahumada Torres:
- Dr. Pablo Richter Duk:
- Mcs. Sylvia v. Copaja:
- Mcs. Adriana Carrasco:
- Dra. Marcia Cazanga:





Nací en el mes de Diciembre de 1981, mi madre, Magali, me bautizó bajo el nombre de Carlos Esteban. Tuve la fortuna de crecer en un bello hogar junto a mis abuelos quienes fueron fundamentales en mi formación, y más aún, tuve el privilegio de contar con una gran familia unida y protagonista de cada uno de mis aprendizajes, decisiones, fracasos y alegrías.

Mis convicciones profesionales siempre apuntaron a las ciencias, un camino difícil pero muy apasionante, desde pequeño me caracterice por ser un muy buen observador, explorador y constructor de mis propios proyectos, transformando mis planes de infancia en realidades, las ideas que circulaban en mi cabeza prontamente tomaban forma y con un par de materiales se concretizaban. Fui un niño muy inquieto y persistente con mis pensamientos.

Mi enseñanza básica fue bastante dinámica, pertencí a varios colegios hasta que finalmente me radiqué en el Colegio San Ignacio donde cursé mi educación media, y donde además obtuve buenos amigos que me acompañan hasta hoy.

El tiempo pasó y se acercó la hora de tomar la difícil decisión sobre que haría el resto de mi vida, tenía mis gustos definidos y mis ideas vocacionales claras, pero desconocía como poder aunar todos mis sueños en una sola carrera universitaria, eran tantas mis inquietudes y necesitaba abarcarlas y hacerme cargo de cada una de ellas. Es así como felizmente ingresé a la Universidad de Chile para enfrentar un nuevo desafío como estudiante de Química Ambiental. Debo reconocer que los primeros años de carrera no fueron nada fáciles, tuve que adecuar me a un ritmo de trabajo muy riguroso que en reiteradas ocasiones me frustró y me hizo tener dudas sobre mis decisiones, afortunadamente esta situación mejoró con el tiempo y comencé a encantarme con la Universidad, con los profesores, con el ambiente de estudio y con el grupo humano con el que compartía, mis compañeros, que más tarde serían mis amigos. Hoy cuando dejo de ser estudiante para convertirme en un profesional, puedo afirmar con certeza que no me equivoqué. Espero poder retribuir todo lo aprendido estos años y aportar para que este sea un lugar un poco mejor. Por Marcela.



*De todos a quienes podría dedicarles este  
trabajo, y todo lo que esto representa,  
hay tres a quienes quiero destacar:  
Magali Tarsetti, Inés Calderon y Mirko Tarsetti.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a Magali mi madre, Inés y Mirko mis nonos. Gracias a su amor, esfuerzo y apoyo incondicional es que ahora puedo concluir esta etapa. Agradezco también a todos los que en algún momento me apoyaron, a Marcela, mis primos, tíos y amigos.

Agradezco también a las personas que conocí durante la realización de este trabajo, que, me acompañaron y compartieron conmigo este proceso. Por el tiempo que me dedicaron, por los consejos, por su amistad, su buena voluntad y preocupación agradezco a Catalina, Adolfo, Carla, Betsabet, Loreto, Cristina, Ady, Jorge, Mauro, Pamela, Mario, Claudio, Viviana y a mis profesores Inés y Pablo.

Me corresponde además agradecer por el financiamiento de este trabajo al proyecto Fondecyt N° 1080357.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS



Contenido	página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aguas Servidas en la Región Metropolitana.....	1
1.2. Tratamiento de las aguas servidas.....	3
1.2.1. Tratamiento preliminar.....	3
1.2.2. Tratamiento primario.....	3
1.2.3. Tratamiento secundario.....	4
1.2.4. Tratamiento terciario.....	5
1.3. Tratamiento de lodos, origen y composición de los biosólidos.....	7
1.4. Biosólidos.....	9
1.4.1. Composición de biosólidos.....	9
1.4.2. Posibilidades de disposición de biosólidos.....	10
1.5. Nonilfenol.....	14
1.5.1. Toxicidad.....	17
1.6. Ensayo biomimético.....	20
Hipótesis.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. Materiales.....	27
2.1.1. Adsorventes desecante y soportes.....	27



2.1.2. Equipos.....	27
2.1.3. Estándares.....	28
2.1.4. Material de vidrio.....	28
2.1.5. Muestras.....	29
2.1.6. Reactivos.....	29
2.1.7. Semillas.....	30
2.1.8. Solventes.....	30
2.2. Métodos.....	31
2.2.1. Elección de analitos.....	31
2.2.2. Caracterización cromatográfica GC-MS.....	31
2.2.3. Obtención y caracterización de biosólidos y suelo.....	32
2.2.4. Enriquecimiento de biosólido con NF.....	33
2.2.5. Ensayo con plantas de trigo.....	34
2.2.6. Metodología de extracción.....	36
2.2.6.1. Extracción en plantas de trigo.....	36
2.2.6.2. Extracción en suelo con distintas dosis de biosólido.....	37
2.2.6.3. Extracción A.S.E.(ensayo biomimético).....	38
2.2.7. Metodología de secado y limpieza de extractos (clean up).....	38
2.2.7.1. Limpieza de extractos de biosólido y suelo.....	39
2.2.7.2. Limpieza de extractos de plantas.....	39
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
3.1. Análisis previos.....	41
3.1.1. Caracterización química de suelo y biosólido.....	42

3.1.2. Determinación de humedad en suelo, biosólido y mezclas.....	43
3.1.3. Curvas de calibración.....	44
3.1.4. Determinación de Límites de detección y cuantificación instrumentales.....	45
3.1.5. Influencia de la limpieza de extractos en la recuperación de los analitos.....	47
3.2. Contenido total de alquilfenoles en las muestras.....	49
3.3. Ensayo de biodisponibilidad de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenoles utilizando como indicador plantas de trigo.....	52
3.4. Ensayo de biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo con biosólido enriquecido.....	57
3.5. Ensayo biomimético.....	64
3.5.1 Validación de método biomimético de 4-NFE y 4-NFE.....	68
3.6. Efecto de la aplicación de biosólido en el crecimiento de trigo.....	73
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>V. REFERENCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>83</b>
6.1. ANEXO I: Espectros de masa de analitos seleccionados.....	84
6.2. ANEXO II: Cálculo de preparación de dosis de biosólido .....	87
6.3. ANEXO III: Ecuaciones para calculo de LD y LC.....	89





## ÍNDICE DE TABLAS



Tabla	página
Tabla 1. Composición típica de lodos.....	7
Tabla 2. Cantidad máxima de lodo para ser aplicada en suelos.....	13
Tabla 3. Límites para NF en lodos en países europeos .....	18
Tabla 4. Caracterización cromatográfica de los alquilfenoles seleccionados.....	32
Tabla 5. Caracterización de los suelos y biosólidos muestreados en 2008.....	41
Tabla 6. Determinación de humedad en las muestras.....	43
Tabla 7. Curvas de calibración de los diferentes analitos seleccionados.....	44
Tabla 8. Determinación de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) instrumentales.....	46
Tabla 9. Validación del método de limpieza extractos de plantas.....	47
Tabla 10. Validación del método de limpieza extractos de biosólido.....	48
Tabla 11. Concentración total de alquilfenoles en muestras de suelo y biosólido en mg/kg.....	49
Tabla 12. Concentración total de 4-NF en dosis de biosólido enriquecido (BE) en mg/kg.....	51
Tabla 13. Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido (B) en dosis de 100Mg/ha.....	53
Tabla 14. Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido (B) en dosis de 200 Mg/ha.....	53
Tabla 15. Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido enriquecido con 4-NF (BE) en dosis de 100 Mg/kg.....	57
Tabla 16. Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido enriquecido con 4-NF (BE) en dosis de 200 Mg/ha.....	58
Tabla 17. Biodisponibilidad de 4-NF en trigo, para distintas dosis de biosólido enriquecido con NF.....	62
Tabla 18. Extracción biomimética A.S.E.....	65

**Tabla 19.** Valores estimados de biodisponibilidad utilizando método biomimético y su porcentaje con respecto a los valores reales.....69

**Tabla 20.** Concentración total de 4-NF en el suelo y biodisponibilidad en trigo.....70



## ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figuras</b>	<b>página</b>
<b>Figura 1.</b> Vías de eliminación aeróbica y anaeróbica de etoxilatos de alquilfenol.....	16
<b>Figura 2.</b> Equipo A.S.E.100 para extracción acelerada con solventes presurizados.....	24
<b>Figura 3.</b> Cultivo de trigo en invernadero para determinación de biodisponibilidad de etoxilatos de alquilfenol y alquilfenoles.....	35
<b>Figura 4.</b> Contenido de alquilfenoles en trigo tratado con B100 y B200.....	54
<b>Figura 5.</b> Contenido de alquilfenoles en trigo tratado con BE100 y BE200.....	59
<b>Figura 6.</b> Biodisponibilidad de 4-NF en parte aérea y raíz de trigo.....	63
<b>Figura 7.</b> Correlación entre la biodisponibilidad de 4-NF en raíz y parte aérea de trigo y el resultado de la extracción biomimética A.S.E., para este analito.....	66
<b>Figura 8.</b> Correlación entre la biodisponibilidad de 4-NFE en raíz y parte aérea de trigo y el resultado de la extracción biomimética A.S.E., para este analito.....	67
<b>Figura 9.</b> Esquema comparativo entre un método biomimético y un método tradicional de extracción en plantas de invernadero.....	72
<b>Figura 10.</b> Efecto de dosis de biosólido en crecimiento de las distintas partes de plantas de trigo.....	74
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de analitos seleccionados.....	84
<b>Figura 12.</b> Fragmento ampliado de cromatograma correspondiente al conjunto de señales pertenecientes a 4-NF.....	85
<b>Figura 13.</b> Fragmento ampliado de cromatograma, correspondiente al conjunto de señales pertenecientes a 4-NFE.....	85
<b>Figura 14.</b> Espectros de masas: (a) 4-t-OP; (b) TBA; (c) 4-NF; (d) 4-n-OP; (e) 4-OPE; (f) 4-NFE.....	86

## ABREVIATURAS

4-NF: 4-nonilfenol

4-NFE: 4-nonilfenol-etoxilato

4-NFE: 4-nonilfenol-etoxilato

4-n-OF: 4-n-octilfenol

4-OFE: 4-octilfenol-etoxilato

4-t-OF: 4-tert-octilfenol

ASE: Acelerated Solvent Extraccion (Extracción Acelerada con Solvente).

NF: nonilfenol (técnico, mezcla de isómeros).



## RESUMEN

Compuestos orgánicos tales como etoxilatos de nonilfenol y su producto de degradación nonilfenol, presentes en detergentes y en una gran variedad de insumos de uso masivo, son sustancias tóxicas, bioacumulables, ampliamente utilizadas en la industria a nivel mundial, e identificadas como disruptores endocrinos.

Sumado a la problemática ambiental de la disposición de la creciente cantidad de biosólidos generados en las plantas de tratamiento de aguas servidas, está el hecho de que éstos constituyen un importante reservorio de etoxilatos de alquilfenol y alquilfenoles, entre otras sustancias tóxicas. En vista de la posibilidad de utilización de estos biosólidos como complemento de la fertilización inorgánica de suelos agrícolas, en lugar de su disposición como sólidos peligrosos en rellenos sanitarios, se presenta la problemática de estimar en forma expedita y confiable la biodisponibilidad de las sustancias tóxicas presentes en ellos. En este contexto, el desarrollo de un método de extracción biomimético, que simule la absorción de estos compuestos por la planta, constituye una alternativa rápida y sencilla al ensayo con organismos biológicos.

Los resultados indican que 4-NFE y su producto de degradación 4-NF, identificado como disruptor endocrino, son las especies estudiadas más abundantes en el biosólido. Además, éstas especies son las que tienen la mayor biodisponibilidad en trigo (*triticum aestivum*), con concentraciones de hasta 33 mg/kg de 4-NF y 9,5 mg/kg de 4-NFE.

Por otra parte, la concentración biodisponible de alquilfenoles es una pequeña fracción de su concentración total en el suelo tratado con biosólido, por lo que la extracción exhaustiva de estas especies, no es representativa de su biodisponibilidad.

Se estableció un método de extracción biomimético basado en la extracción presurizada de suelo tratado con diferentes dosis de biosólido, utilizando agua como solvente de extracción. El método biomimético propuesto permite estimar la biodisponibilidad de alquilfenoles de manera simple y expedita, en comparación con ensayos en plantas, y es más representativo de la biodisponibilidad que la extracción exhaustiva de estos analitos de la mezcla suelo-biosólido.

## ABSTRACT

Organic compounds such as nonylphenol ethoxylates and nonylphenol degradation product present in detergents and into a variety of inputs of widespread use, are toxic substances, bioaccumulative, widely used in industry worldwide, and identified as endocrine disruptors.

In addition to the environmental problem of disposal of the increasing quantity of biosolids generated at waste water treatment plants, is the fact that they constitute an important reservoir of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols, among other toxic substances. In view of the possibility of using these biosolids as complement of for the inorganic fertilizers in agricultural soils, rather than their disposal as hazardous solid into landfills, the possibility of estimating reliable and expeditiously the bioavailability of toxic substances in them is presented. In this context, the development of a biomimetic extraction method, which simulates the absorption of these compounds by the plant is a quick and ,simple alternative to test biological organisms.

The results indicate that 4-NFE and its degradation product 4-NF, identified as endocrine disruptor, are the more abundant species in the biosolid. Besides, these species are those which have the higher bioavailability in wheat (*Triticum aestivum*), with concentrations up to 33 mg / kg of 4-NF and 9.5 mg / kg of 4-NFE.

Moreover, the bioavailable concentration of alkylphenols corresponds to a small fraction of their total concentration in the soil treated with biosolids, so that the exhaustive extraction of these species is not representative of its bioavailability.

A biomimetic extraction method based on pressurized extraction of soil treated with different amounts of biosolids was developed, using water as a solvent extractant. The proposed biomimetic method to estimate the bioavailability of alkylphenols is simple and rapid, compared with with plants assays, and it is more representative of the bioavailability than the exhaustive extraction of these analytes from the soil-biosolid mixture.



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aguas Servidas en la Región Metropolitana

Por aguas servidas urbanas se entiende aquellos residuos líquidos recolectados por los sistemas de alcantarillado, pudiendo provenir de zonas residenciales, comerciales o industriales (en este caso también llamadas aguas residuales industriales) los que transportan sustancias fecales, orina, desechos sólidos y basura.

La generación de aguas servidas o residuales es un producto propio de todo asentamiento humano moderno que cuente con una red de alcantarillado. Las características en cuanto a cantidad y composición de estas aguas servidas dependerán de variados factores como el tamaño de la población, el clima de la zona, las costumbres de las personas asociadas al consumo de agua, el nivel de industrialización instalada en el área y las actividades productivas desarrolladas, la extensión de la red captadora o alcantarillado, entre otros.

A pesar de la variabilidad en cantidad y composición de las aguas servidas, una composición típica corresponde a un 99,9% de agua y tan solo un 0,1% de sólidos. El 70% de estos sólidos corresponden a material orgánico compuesto por proteínas (40-60%), carbohidratos (25-50%), grasas y aceites (10%). El otro 30% del componente sólido corresponde a material inorgánico constituido mayoritariamente por arena, sales y metales (Becerra, J. P. 2003).

La Región Metropolitana en nuestro país tiene una superficie de 15.403,2 km<sup>2</sup>, lo que representa solamente el 2,0 % de la superficie del país. La población regional sin embargo es de 6.061.185 habitantes, lo que equivale al 40,1% de la población nacional, alcanzando una densidad de 393 hab./km<sup>2</sup> (INE, 2009). En la Región Metropolitana prácticamente la totalidad de las aguas servidas generadas son vertidas al Zanjón de la Aguada y río Mapocho abarcando, aproximadamente, un 60% y 35%, respectivamente. (SISS, 2009) El tratamiento de estas aguas previo a su incorporación a cauces de agua naturales, corresponde a una medida de saneamiento hídrico enmarcada en el *Plan de Saneamiento hídrico de la Cuenca de Santiago (PSHCS)*, puesto en marcha en 2001, que busca evitar la contaminación hídrica de estos cauces. Así desde 2001, con una cobertura de un 39,4%, el tratamiento de aguas en la región metropolitana ha mostrado una tendencia creciente y sostenida alcanzando una cobertura combinada de un 82,3% hasta diciembre de 2007 (SISS, 2009) con el funcionamiento de dos de las tres Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas (PTAS) contempladas en el plan, las cuales corresponden a El Trebal y La Farfana.

El PSHCS comenzó sus operaciones en 2001 con la puesta en marcha de la PTAS El Trebal, instalada en la comuna de Padre Hurtado y que trata un caudal medio aproximado de 3,3 m<sup>3</sup>/s, aunque tiene una capacidad media de diseño de 4,4 m<sup>3</sup>/s. Ese mismo año se inició la construcción de la segunda PTAS, La Farfana, entrando en operaciones en 2004 con una capacidad media de diseño de 8,8 m<sup>3</sup>/s, posicionándose como la PTAS más grande de América Latina y una de las más grandes del mundo.

De esta forma, se pretende en 2009, con la entrada en operaciones de la tercera PTAS Los Nogales con una capacidad de 6,6 m<sup>3</sup>/s alcanzar la total cobertura de tratamiento de aguas servidas en la Región Metropolitana (SISS, 2009). Para entonces se estima

una generación de lodos que alcanzará unas 112.000 t/año, lo cual hace patente la problemática ambiental que implica el destino de estos desechos.

## **1.2. Tratamiento de las aguas servidas**

Para cumplir con el objetivo propuesto en el PSHCS de evitar la contaminación hídrica de los cuerpos de agua receptores de aguas servidas, éstas deben ser previamente procesadas, a través, de una serie de procesos unitarios que remueven los contaminantes de estas aguas residuales.

### **1.2.1. Tratamiento preliminar**

Esta etapa tiene como objetivo remover el material grueso presente en las aguas residuales tales como restos orgánicos y basura. Esto se hace principalmente a través de rejillas y mallas de diferente grosor ubicadas al ingreso de la planta de tratamiento, además en forma complementaria se utilizan estanques desarenadores aireados que por efecto de la gravedad remueven arena y arcillas.

### **1.2.2. Tratamiento primario**

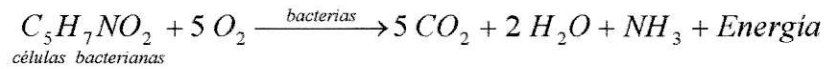
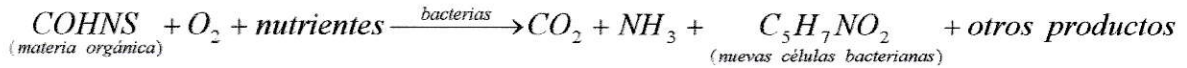
El objetivo de esta etapa, es la remoción de sólidos más pequeños que oscilan entre los 0,05 a 1,0 mm. (Becerra, J. P., 2003) Para esto se hace circular el agua en grandes

estanques de unos 40 m de diámetro, donde por efecto de la gravedad se produce la sedimentación de las partículas permaneciendo suspendida solo la fracción más fina.

El tratamiento preliminar y tratamiento primario son conocidos en conjunto como *procesos físicos* dentro de la línea de tratamiento de agua, ya que en ambos casos su finalidad es separar los sólidos del agua. De este tratamiento primario se obtienen los denominados lodos primarios con un contenido de sólidos de entre un 3 a 7% (Becerra, J. P., 2003). Por lodo se entiende cualquier residuo semisólido que ha sido generado en plantas de tratamiento de efluentes que se descarguen a la atmósfera, de aguas servidas, de residuos industriales líquidos o de agua potable. Se incluyen en esta definición los residuos en forma de fangos, barros o sedimentos provenientes de procesos, equipos o unidades de industrias o de cualquier actividad (D.S. N° 148. 2003).

### **1.2.3. Tratamiento secundario**

El objetivo de esta etapa del tratamiento, es la remoción de la materia orgánica que aún permanece en las aguas luego de los tratamientos físicos anteriores. El más común se trata de un tratamiento biológico (proceso biológico), que se basa en la capacidad de los microorganismos, principalmente bacterias, de utilizar los compuestos orgánicos presentes en las aguas como fuente de carbono, metabolizándolos y generando principalmente gases como  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ , agua y biomasa. (Met calf & Eddy. 1995)



Los efluentes resultantes de este proceso biológico son sometidos a un proceso de sedimentación del que se obtiene una fracción líquida y los llamados lodos secundarios, de los cuales una fracción es devuelta a los estanques correspondientes al tratamiento secundario, para mantener la biomasa requerida de microorganismos. Los lodos obtenidos luego de esta etapa del tratamiento se denominan lodos secundarios y normalmente presentan un contenido bajo de sólidos de entre un 0,5 y un 2%. (Becerra, J. P., 2003)

#### 1.2.4. Tratamiento terciario

En determinados casos, si se desea obtener aguas de mejor calidad previo a la incorporación a cursos de agua naturales, los efluentes son sometidos a un tratamiento terciario que consiste en la adición de floculantes o coagulantes que provocan la separación del material coloidal ya sea por decantación o flotación respectivamente, esto se realiza principalmente para eliminar el contenido de nitrógeno y fósforo y así evitar problemas de eutroficación en los cauces naturales.

La fracción líquida resultante del tratamiento primario, secundario y terciario si corresponde, se somete finalmente a un proceso de desinfección (proceso químico)

que habitualmente consiste en la inyección de cloro gaseoso, aunque existen también métodos alternativos como la irradiación UV o la inyección de ozono, que reemplazan la cloración debido a la posible formación de compuestos clorados cancerígenos.

### 1.3. Tratamiento de lodos, origen y composición de los biosólidos

Tabla 1: Composición típica de lodos

Característica	Lodo primario crudo		Lodo activado
	Rango	Valor Típico	Rango
Sólidos secos totales (ST)%	2-8	5	0,83-1,16
Sólidos volátiles (% de ST)	60-80	65	59-88
Grasas y aceites solubles en éter (% de ST)	6-30	-	-
Grasas y aceites extractable en éter (% de ST)	7-35	-	5-12
Proteínas (% de ST)	20-30	25	32-41
Nitrógeno (N, % de ST)	1,5-4	2,5	2,4-5
Fósforo ( $P_2O_5$ , % de ST)	0,8-2,8	1,6	2,8-11
Potasio ( $K_2O$ , % de ST)	0-1	0,4	0,5-0,7
Celulosa (% de ST)	8-15	10	-
Hierro (no como sulfuro)	2-4	2,5	-
Sílice ( $SiO_2$ , % de ST)	15-20	-	-
pH	5-8	6	6,5-8
Alcalinidad (mg/L como $CaCO_3$ )	500-1500	600	580-1100
Ácidos orgánicos (mg/L como HAC)	200-2000	500	1100-1700
Poder calorífico (MJ/kg)	23000-29000	25500	18500-23000

(Fuente: Met calf & Eddy. 2003)

Los lodos obtenidos en el proceso de tratamiento de las aguas servidas, son una mezcla compleja compuesta en un 98% de agua. La composición típica de los lodos primarios se muestra en la Tabla 1. Estos son a su vez tratados a través de la siguiente serie de procesos:

- a) **Espesamiento:** Los lodos generados durante el proceso de tratamiento de las aguas servidas son mezclados y espesados utilizando espesadores de banda, lo que concentra el contenido de sólidos hasta un 5%, en tanto que las aguas obtenidas en este proceso son retornadas al inicio del tratamiento, también puede realizarse por precipitación, flotación o centrifugación. (Yagüe, F.C. y col., 1987)

- b) **Estabilización:** proceso de aproximadamente tres semanas de duración, en que los lodos son calentados utilizando un flujo de agua caliente, que permite disminuir alrededor de un 50% del contenido de materia orgánica presente en el lodo. Esto se consigue a través de una digestión anaeróbica gracias a la actividad de microorganismos, en varias etapas. Primero la hidrólisis enzimática que descompone polímeros orgánicos y lípidos de alto peso molecular en aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos, purinas y pirimidinas. Posteriormente la acidogénesis que a través de bacterias transforma los compuestos de la primera etapa en ácido acético, hidrógeno, CO<sub>2</sub>, metanol, etanol lactato, entre otros. Finalmente en la metanogénesis, un grupo de microorganismos transforma el ácido acético y el hidrógeno en gas metano y CO<sub>2</sub> (Met calf & Eddy, 2003). Como consecuencia de este proceso se genera biogás como subproducto, compuesto principalmente por un 60% de metano, 30% de dióxido de carbono y un 10% de otros compuestos como sulfuro de hidrógeno e hidrógeno gaseoso.
- c) **Deshidratación:** Proceso que permite la reducción del volumen de los lodos a través de la reducción del contenido de agua de un 95% a un 75%. Normalmente se realiza a través de centrifugas o secado por calor, entre otros. Finalmente los lodos son dispuestos en canchas de secado donde su contenido de agua disminuye entre 35% a 40%. (Yagüe, F.C. y col., 1987)



## **1.4. Biosólidos**

El biosólido propiamente tal corresponde al material seco, tratado biológicamente resultante del tratamiento de lodos anteriormente descrito. Los componentes típicos del biosólido están determinados por una parte, por el origen y características de las aguas servidas de la cual provienen y por otra parte, por el tipo de tratamiento a que éstas son sometidas.

### **1.4.1. Composición de biosólidos**

Los componentes típicos de los biosólidos puede clasificarse en tres grandes grupos. De mayor a menor abundancia estos son: compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos y microorganismos. A su vez los compuestos orgánicos pueden diferenciarse entre compuestos tóxicos y no tóxicos. Si bien los compuestos tóxicos se encuentran en menor cantidad, existe una gran diversidad de éstos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs, 1-10 mg/kg ms), plaguicidas, bifenilos policlorados (BPCs, 1-20 mg/kg ms), dioxinas y furanos (PCDD/F), compuestos orgánicos volátiles (COVs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles y tensioactivos (mayor a 10 mg/Kg ms) dentro de los cuales podemos identificar a su vez iónicos y no iónicos, correspondiente a estos últimos, tenemos derivados de aminas y amidas, ésteres de ácidos grasos, alcoholes lineales etoxilados y etoxilatos de alquilfenol tales como NF (Epstein E., 2003). El componente orgánico considerado no tóxico está compuesto principalmente por proteínas, aceites, grasas y ácidos orgánicos, que sin embargo provee sitios activos para la sorción de compuestos orgánicos tóxicos. Por

otra parte los compuestos inorgánicos en orden de mayor a menor abundancia, son comúnmente nitrógeno entre 1 a 6% ms, fósforo entre 0,8 a 6,1% ms, mientras que potasio, calcio y magnesio se encuentran con abundancias inferiores al 1%. El contenido de metales es variable dependiendo del origen de las aguas servidas, encontrando principalmente cobre, plomo, cromo, níquel, arsénico y otros. (Yagüe, F.C. y col., 1987). Los microorganismos constituyen el tercer grupo en abundancia presente en los biosólidos. Estos provienen principalmente de los residuos orgánicos tanto vegetales como animales y consisten principalmente en parásitos presentes en forma de huevos, virus y bacterias tales como Coliformes y Salmonella spp.

#### **1.4.2. Posibilidades de disposición de biosólidos**

Existen variadas formas de disposición de biosólidos, entre ellas se puede mencionar la utilización como mejoradores de suelos agrícolas y forestales, aplicación superficial en áreas verdes, disposición en vertederos o monorrellenos especialmente dispuestos para esto (recurso históricamente utilizado en la Región Metropolitana), la incineración y el vertido de desechos al mar, prohibido desde 2000 (D.S. N° 148. 2003), excepto para aquellos provenientes de plantas de agua potable.

En principio se puede discriminar la disposición final de los biosólidos en dos grupos. Uno de ellos que considera a los biosólidos meramente como un residuo sólido, que debiera ser adecuadamente eliminado. La otra visión busca aprovechar los beneficios que podría implicar su reciclaje, alternativa que se presenta como una de las formas más seguras ambientalmente y económicamente más conveniente de deshacerse de

los biosólidos. En este sentido, es que en marzo de 1999 CONAMA, comenzó el proceso de creación del *Reglamento sobre manejo de Lodos no peligrosos generados en Plantas de Tratamiento de Aguas* que fue finalmente aprobado en enero de 2005 y cuyos objetivos son i) proteger la salud de la población y prevenir el deterioro de los recursos naturales, ii) regular el manejo sanitario (manejo, transporte y disposición final) y iii) regular la disposición benéfica al suelo cuando sus condiciones químicas, físicas y biológicas lo permitan.

En la elaboración de este reglamento se han tomado en cuenta los antecedentes técnicos elaborados por el SAG desde 2001, Aguas Andinas e INIA, que han desarrollado trabajos en conjunto con el fin de estudiar la valoración agrícola de los biosólidos provenientes de las PTAS como fertilizante. Con este fin se hizo un estudio en predios agrícolas de las comunas de Paine, San Bernardo y Buin. Para la valoración de los biosólidos se utilizaron cultivos de trigo, avena, tomate, poroto verde, maíz choclero, uva de mesa y durazno. Por una parte se observó que los cultivos mostraron raíces de mejor calidad. Además en esas especies se alcanzó un mayor contenido de nitrógeno en sus hojas, la aplicación de lodos permitió también incrementar gradualmente el nivel de materia orgánica, micro y macro nutrientes, acondicionando el suelo y mejorando sus propiedades para fines agrícolas. Por otra parte la aplicación de biosólidos representó un buen aporte de fósforo con contenidos de 1,6% aproximadamente, lo que permitiría en muchos casos reemplazar en gran medida la aplicación de fertilizantes fosfatados minerales. Así luego de tres años de estudios Aguas Andinas e INIA han pasado a una etapa de evaluación a escala comercial en la cual se evalúa la productividad de las especies y los efectos del biosólido sobre el suelo y las estructuras vegetales comestibles (INIA., 2008)

A pesar de los beneficios mencionados con respecto al reciclaje y aplicación de biosólidos, hay también aprensiones y limitaciones en el uso de éstos, debido a la presencia de elementos contaminantes y potencialmente nocivos como los antes mencionados, los cuales una vez en el medio ambiente pueden ser liberados a la atmósfera, retenidos en el suelo, lixiviados a través de la fase líquida del suelo contaminando acuíferos, ser degradados química y biológicamente a productos más tóxicos, ser absorbidos por las plantas o bioacumulados en organismos. Por esto se han establecido dosis máximas aplicables a suelos y límites precisos para patógenos y metales principalmente dependiendo del suelo y tipo de lodo, en distintos países europeos y norteamericanos.

A pesar de que en nuestro país, no se ha considerado la inclusión de contaminantes orgánicos dentro de la norma regulatoria de aplicación de lodos sanitarios (INN, 2009), el proyecto de reglamento de lodos de CONAMA indica restricciones en la dosis de aplicación de biosólidos dependiendo del uso que se le da al suelo. Las dosis se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2: Cantidad máxima de lodo para ser aplicada en suelos, según (EC, 2001)**

<b>Directiva 86/278/EEC Comunidad Europea</b>	<b>Tasa de aplicación (t/ha ms)*</b>
Austria	2,5-10/2 años (a)
Bélgica (Flandes)	4/2 años (suelo arable)
	2/2 años (suelo de pastoreo)
Bélgica (Valonia)	12/3 años (suelo arable)
	6/3 años (suelo pastoreo)
Dinamarca	10/año
Alemania	5/3 años
Irlanda	2/año
Luxemburgo	3/año
Países Bajos	2-4/año (suelo arable) (b)
	1-2/año (suelo de pastoreo) (b)
Portugal	6/año
Canadá (c)	135 kg N/5 años (lodo digerido anaeróbicamente)
	8/5 años (lodo deshidratado o seco)
Chile (d)	30/año (suelo agrícola y forestales)
	50/año (suelos degradados)

\* Tasa de aplicación se interpreta como toneladas por hectárea por año, de lodo sobre materia seca.

(a) Dependiente del suelo, la masa seca y el tipo de lodo

(b) Dependiente del estado del lodo (líquido o sólido)

(c) Canaria Ministry of environment and Ministry Agricultura Food Rural Affairs (1996)

(d) Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas (D.S. N° 123. 2006)

## 1.5. Nonilfenol

Los polietoxilatos de alquilfenol, tales como, etoxilatos de nonilfenol y octilfenol y sus productos de degradación como nonilfenol y octilfenol se encuentran entre las sustancias químicas más ampliamente utilizadas como detergentes y tensioactivos a nivel mundial desde mediados del siglo pasado. Su utilización se extiende en la composición de productos de limpieza y detergentes tanto domésticos como industriales, en insumos textiles, en la industria petrolera, la industria papelera, la formulación de pesticidas, agroquímicos y otros, constituyendo uno de los grupos de químicos orgánicos de más alta producción a nivel mundial. Por otra parte, se desconoce algún origen natural de este tipo de sustancias y su presencia es atribuida exclusivamente a la actividad antropogénica (Langford, K.H. y col., 2005). Uno de los principales destinos de este tipo de sustancias químicas corresponde a los lodos resultantes de las plantas de tratamiento de aguas servidas (180-990 mg/kg) (La Guardia, M.J. y col. 2001), cuya disposición es en si misma una problemática ambiental actual a nivel mundial, a lo cual se suma el contenido de sustancias potencialmente tóxicas que estos desechos contienen.

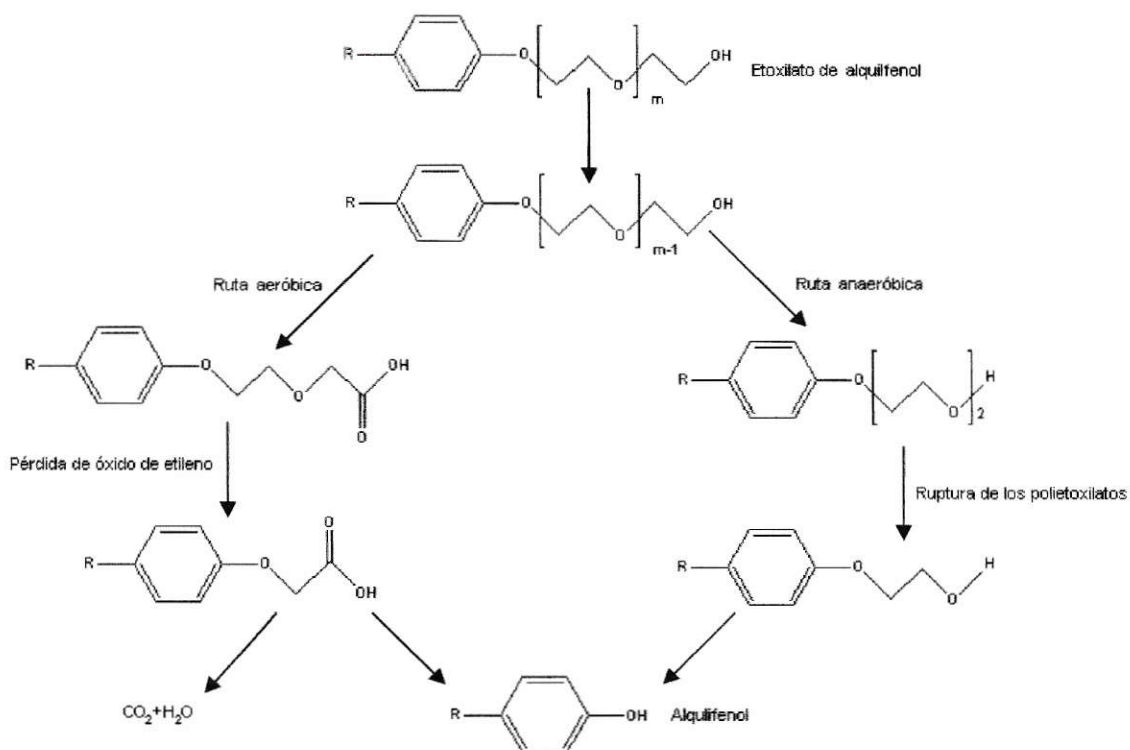
En 2006, se publicaron los resultados de un estudio (Kinney, C.A. y col., 2006) que investigaba la presencia de 87 contaminantes orgánicos en varios biosólidos provenientes de distintas plantas de tratamiento de aguas. En los cuales se detectó entre treinta a cuarenta y cinco contaminantes orgánicos. Nonilfenol mostró la concentración media más alta, 261 mg/kg con un máximo de 1520 mg/kg y un mínimo de 2,18 mg/kg, lo cual confirma la presencia de este compuesto en una matriz como los biosólidos (Devin-Clarke y col., 2008).

Los polietoxilatos de alquilfenol son contaminantes orgánicos de baja solubilidad en agua. Su eliminación del medio ambiente dependerá principalmente de los procesos de degradación y absorción en la matriz en que se encuentre, lo cual está a su vez influenciado por el grado de etoxilación de la molécula. Los productos de degradación como los alquilfenoles, son más hidrofóbicos en el medio natural y más susceptibles de sorberse en las partículas de biosólido, en los sólidos en suspensión o en la materia orgánica a través de interacciones por sorción hidrofóbica, ya que solamente se desprotonarían cuando el pH excede su  $pK_a$  ( $pH > 10$ ), por lo que la molécula no tendría carga eléctrica bajo la mayoría de las condiciones ambientales, encontrándose menos disponible y menos susceptible de ser degradada por microorganismos (Xia, K., y Yoon Jeoung, C. 2004).

Por otra parte, cualquier polietoxilato de alquilfenol con varios grupos etoxy, tendrá propiedades más hidrofílicas que lo harán permanecer más tiempo disuelto en el medio acuático en el cual es más probable que ocurra la degradación de la molécula a alquilfenoles con mayor actividad estrogénica. Un valor bajo de  $\text{Lóg } K_{ow}$ , además, indicaría una pobre afinidad de las moléculas de polietoxilatos de alquilfenol por las membranas biológicas, dejando al mecanismo de degradación como el más importante en la eliminación de estos compuestos. Sin embargo, en moléculas de alquilfenol (producto de degradación) con cadenas cortas, tales como nonilfenol con un valor de  $\text{Lóg } K_{ow}$  de 4,8, la absorción en membranas biológicas probablemente sea un mecanismo de eliminación importante (Langford, K.H. y col. 2005).

Otra vía de eliminación bajo condiciones aeróbicas consiste en la degradación de los polietoxilatos de alquilfenol a través de la pérdida de unidades de óxido de etileno, o la

formación de etoxilatos carboxilados que terminarán finalmente en moléculas de  $\text{CO}_2$  y agua. En condiciones anaeróbicas en cambio, se generará el alquilfenol por ruptura de los polietoxilatos de alquilfenol. De esta forma vemos que la degradación, eliminación del medio, transporte, sorción y desorción son fenómenos que dependerán en gran parte de las propiedades físicas de la matriz en que encuentren y de los factores medioambientales como, temperatura y pH (Pignatello, J.J. y Xing, B. 1996).



**Figura 1:** Vías de eliminación aeróbica y anaeróbica de etoxilatos de alquilfenol (Fuente: Marican, A. 2008)



### 1.5.1. Toxicidad

Si bien los etoxilatos de alquilfenol no son consideradas sustancias tóxicas en sí mismas, la descomposición de estos a través de distintas rutas genera alquilfenoles tales como nonilfenol, En el caso de NF se sabe que este posee una toxicidad aguda, que es bioacumulable en microorganismos y plantas debido a su capacidad de interactuar con membranas biológicas, además ha sido identificado como disruptor endocrino (CDEs), al punto que han sido prohibidos y su uso normado en algunos países de Europa, siendo catalogado como agente contaminante prioritario en el *Water Framework Directive* de la Unión Europea (EU, 2001), clasificándolos como disruptores de funciones endocrinas definiéndolos como “sustancias exógenas que causan efectos adversos a la salud en un organismo intacto o su progenie, producto de cambios en su función endocrina”. Se ha observado su capacidad de alterar el desarrollo sexual y reproductivo en la fauna salvaje, así como también producen efectos en seres humanos tales como bajo conteo de espermios, pubertad temprana, disfunciones tiroideas e interferencia en funciones endocrinas, (Gadzala-Kopciuch, R. y col. 2007).

En vista de esto último, actualmente existen restricciones para la aplicación de biosólidos a suelos agrícolas en países como Suiza desde 1986, en tanto que la Unión Europea a propuesto límites para nonilfenol y sus etoxilatos en biosólidos de 50 mg/Kg sobre base seca (Nuñez, L. y col., 2007). Suecia y Dinamarca particularmente mantienen límites para NF de 100 y 10 mg/kg ms respectivamente.

**Tabla 3: Límites para NF en lodos en países europeos**

País	Límite (mg/kg ms)
Dinamarca	10
Suecia	100
Comunidad Europea	50

(Fuente: Becerra, J. P. 2003)

Recientemente la UE a través de la Orden PRE/1954/2004, de 22 de junio, modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol), como consecuencia de la evolución de la normativa comunitaria en la materia y de la necesidad de incrementar los niveles de protección de la salud humana y del medio ambiente. Se ha publicado la Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003, que modifica la Directiva 76/769/CE del Consejo, respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol) y señala: Como resultado de la evaluación de riesgos, efectuada a nivel comunitario, se limitan su comercialización y usos con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente.

No se pueden poner en el mercado o usar como sustancias o constituyentes de preparados en concentraciones iguales o superiores al 0,1% en masa para los usos siguientes:

## **Restricciones al uso de NFEs y NF en países de la UE. (BOE. 2009)**

- a) Limpieza industrial e institucional, excepto en sistemas controlados y cerrados de limpieza en seco, en la cual el líquido de limpieza se recicla o se incinera.
- b) En sistemas de limpieza con tratamiento especial en los cuales el líquido de limpieza se recicla o se incinera.
- c) Limpieza doméstica.
- d) Tratamiento de los textiles y del cuero, excepto:
  - El tratamiento sin descarga en las aguas residuales.
  - Los sistemas con un tratamiento especial en el que el agua se somete a un tratamiento previo para eliminar completamente la fracción orgánica antes del tratamiento biológico de las aguas residuales (desengrase de pieles ovinas).
- e) Emulsificante en la ganadería para el lavado de pezones por inmersión.
- f) Metalurgia, excepto los usos en sistemas controlados y cerrados en que el líquido de limpieza se recicla o se incinera.
- g) Fabricación de pasta de papel y del papel.
- h) Productos cosméticos.
- i) Otros productos para la higiene personal, excepto los espermicidas. Como coadyuvantes en biocidas y productos fitosanitarios.

## 1.6. Ensayo biomimético

Al existir tantos factores que determinan el comportamiento de un contaminante en el medio ambiente tales como las características del suelo (pH, contenido de materia orgánica, etc.), propiedades químicas de los contaminantes ( $K_{ow}$ ) y condiciones ambientales (precipitaciones, temperatura); la estimación del efecto que tendrá este contaminante sobre los organismos se hace también compleja e imprecisa. Desde la perspectiva de la evaluación de riesgo ambiental en una situación tal como la aplicación de biosólidos al suelo para un determinado uso, surgen conceptos claves para los que, sin embargo, se encuentran variadas definiciones que muchas veces generan confusión e imprecisiones. La biodisponibilidad es un factor importante en la evaluación de riesgo ambiental, depende de las características del suelo y los contaminantes, así como de los organismos presentes, su posición en la cadena trófica, además de la variabilidad de la biodisponibilidad en el tiempo. (Van der Wal, L. y col. 2004)

Biodisponible: El diccionario Inglés de Oxford define disponible como “capaz de ser utilizado; a disposición de; a la mano de”. Este término por lo tanto tiene una inmediatez implícita; lo que es disponible es disponible ahora. Así podemos definir los compuestos biodisponibles como aquellos que están disponibles para cruzar la membrana celular de un organismo desde el medio en que éste habita, en un tiempo determinado. Una vez que el paso a través de la membrana ha ocurrido, el almacenamiento, transformación, asimilación o degradación de los compuestos pueden tener lugar dentro del organismo; sin embargo, estos procesos son obviamente distintos de la transferencia entre el medio y el organismo. La ISO 11074 (2005) define

biodisponibilidad como el grado en el cual los compuestos químicos presentes en el suelo (o sedimentos) pueden ser absorbidos o metabolizados por receptores humanos o ecológicos, o quedar disponibles para interactuar con sistemas biológicos. (Brack W. y col. 2009)

Bioaccesible: El diccionario Inglés de Oxford define accesible como “capaz de ponerse en contacto con o ser alcanzado por”. La definición implica que una fracción de lo que es disponible puede ser alcanzado, pero a menudo no lo es desde un sitio determinado en un tiempo dado. Esta definición, implica una limitación en el tiempo y/o el espacio, evitando que el organismo acceda al compuesto químico inmediatamente. Por lo tanto, definimos el compuesto bioaccesible como aquel que está disponible para cruzar la membrana celular de un organismo desde su medio ambiente, si el organismo tiene acceso al compuesto químico (Semple K. y col. 2004). En este caso puede referirse a un compuesto químico que está ocluido en la materia orgánica del suelo y por lo tanto, no está disponible en un momento determinado, o que tiene una disposición espacial diferente del medio ambiente que habita el organismo. Los contaminantes pueden volverse disponibles en orden de segundos desde estos lugares, tras la liberación desde reservorios lábiles o reversibles, o bien, el propio organismo puede desplazarse y entrar en contacto con el compuesto como por ejemplo con el crecimiento de las raíces. Alternativamente, éstos se pueden liberar en escalas de tiempo mucho más largas (años o décadas) y hacer que el compuesto químico se vuelva entonces bioaccesible. En definitiva, bioaccesibilidad incluiría lo que es inmediatamente biodisponible y lo potencialmente biodisponible. (Semple K. y col. 2004)

A pesar de que los análisis químicos actualmente son capaces de detectar los compuestos individuales en pequeñísimas cantidades, no es posible o práctico pretender analizar todos los compuestos presentes en una muestra ambiental. Por otra parte, sin embargo, enfocar los análisis químicos y la evaluación de riesgo ambiental en contaminantes preseleccionados conlleva el riesgo de ignorar contaminantes desconocidos, inesperados y/o tóxicos, además de proveer solamente información limitada para el diagnóstico y predicción de los efectos adversos. Desde la década de los años ochenta, científicos han desarrollado la idea de combinar los análisis químicos con técnicas de fraccionamiento, y/o pruebas de los efectos en sistemas biológicos, para reducir sistemáticamente la complejidad de los estudios de contaminación en muestras ambientales, descartando las fracciones no tóxicas e identificando esos contaminantes que son efectivamente responsables de los efectos tóxicos (Brack W. y col. 2009).

La mayor parte de los estudios en muestras ambientales se basan en extracciones exhaustivas, con solventes orgánicos. Este enfoque utiliza estos métodos de extracción ya bien establecidos, validados y reproducibles, los cuales son consistentes con los análisis químicos clásicamente utilizados en muestras ambientales, y vienen a representar una aproximación del “peor escenario” posible, ya que al ignorar factores como la biodisponibilidad, probablemente se sobreestime el riesgo que representan los contaminantes de tipo hidrofóbicos. Esto, probablemente sea aceptable en el sentido de un principio de precaución y no sea determinante si la biodisponibilidad es similar para todos los compuestos presentes en una muestra. Sin embargo, ignorar el efecto de la biodisponibilidad, puede representar un obstáculo en el análisis de muestras ambientales, al priorizar contaminantes hidrofóbicos que quizás sean más tóxicos pero

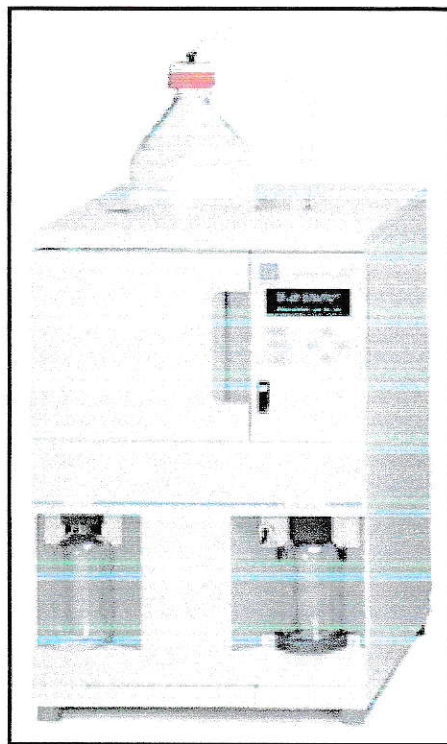
que tengan una baja biodisponibilidad, mientras que se subestima la importancia relativa de las fracciones más polares (Brack W. y col. 2009), que puedan representar riesgo, tal como NF.

Es más relevante determinar la fracción efectivamente biodisponible, que la determinación cuantitativa exhaustiva de un contaminante en una matriz dada. El nivel de contaminantes disponibles para que sean absorbidos por un sistema biológico puede ser mucho más bajo que el contenido total obtenido desde la matriz de suelo, bajo condiciones extremas de extracción. En este plano, la posibilidad de diferenciar entre la fracción extraíble y no extraíble de un compuesto, permitiría relacionar este comportamiento con su eventual labilidad y estimar de esta manera su biodisponibilidad en un sistema ambiental en condiciones naturales (extracción biomimética) y así, determinar si la aplicación de biosólidos a suelos es o no favorable desde este punto de vista. En este sentido la evaluación de la fracción biodisponible resulta compleja cuando se emplea para ello organismos vivos, además de la necesaria inversión de recursos y tiempo. En contraste con el ensayo con plantas para determinar la biodisponibilidad de estas sustancias, por lo tanto, resultaría útil disponer de un método de extracción biomimético para estimar su fracción biodisponible y de sus productos de degradación, el cual sea comparativamente más expedito, sencillo y rápido que el ensayo en cultivos propiamente tal y más representativo que el contenido total de contaminantes en una matriz dada.

El método biomimético que se pretende desarrollar en el presente trabajo está basado en la extracción acelerada (A.S.E.), utilizando solventes poco agresivos presurizados, con un equipo A.S.E. 100 que se muestra en la Figura 2, para la determinación de etoxilatos de alquilfenol (NFEs) y sus metabolitos (NF), el cual será validado en forma

paralela mediante la determinación de absorción de estos analitos a través de ensayos en invernadero con plantas de trigo (*triticum aestivum*).

Los alquilfenoles pueden ser determinados por cromatografía gaseosa acoplada a detector de masa (GC-MS), cromatografía líquida (CL) y cromatografía líquida acoplada a detector de masa (CL-DM). Entre ellas, GC-MS es usada generalmente para la determinación de alquilfenoles en muestras medioambientales, debido a su alta habilidad de separación y bajos límites de detección.



**Figura 2:** Equipo ASE100 para extracción acelerada con solventes presurizados.



**Hipótesis:**

La aplicación de biosólidos a los suelos, además de incrementar el contenido total de contaminantes orgánicos tales como etoxilato de nonilfenol y sus metabolitos, afectaría la biodisponibilidad de éstos, la cual podría ser determinada en forma eficiente a través de un método de extracción acelerada con solvente (ASE) de manera simple.

**Objetivo general:**

Determinar la fracción biodisponible de etoxilatos de nonilfenol y nonilfenol en muestras de biosólidos y suelo, utilizando un sistema biomimético de extracción y la absorción por plantas de trigo para su validación.

**Objetivos específicos:**

- Determinar los contenidos totales de etoxilatos de nonilfenol y sus productos de degradación en muestras de biosólidos, suelos y mezclas suelo-biosólido, utilizando un método de extracción acelerada con solvente (ASE) y determinación por cromatografía gaseosa con detección de masa (GC-MS)
- Determinar la fracción biodisponible del etoxilato de nonilfenol y sus metabolitos utilizando un sistema biomimético de extracción acelerada con solvente (ASE) de manera simple, con solventes no agresivos.

- Determinar la absorción (biodisponibilidad) del grupo etoxilato de nonilfenol y nonilfenol a través de cultivo de trigo en suelos controles y tratados con distintas dosis de biosólidos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Absorbentes desecante y soportes

- Óxido de aluminio 90, neutro, de actividad I, activado por 8 h a 105°C, grado cromatográfico (Merck).
- Sulfato de sodio, activado por 4 h a 400 °C, grado cromatográfico (Merck).
- Lana de vidrio silanizada de Chromatography Research Supplies, Inc.
- Sílica gel activada por 16 h a 130 °C y según corresponda desactivada con 3,3% de agua y equilibrada durante 6 h, grado cromatográfico, Merck.

#### 2.1.2. Equipos

- Balanza analítica Precisa 125 A Quality 0,0001g
- Equipo ASE100®.
- Equipo GC-MS Agilent 6890 Plus / 5973N
- Microbalanza analítica Precisa 0,01mg
- Vortex Mixer KMC-1300, Vision Scientific.
- Agitador mecanico
- Liofilizador L101, Liobras
- Sistema de vacío manifold (Visiprep, Supelco)

### 2.1.3. Estándares

- 4-n-octilfenol (4-n-OF; Dr. Ehrenstorfer; Alemania, 99,0% pureza)
- 4-Nonilfenol (4-NF; Dr. Ehrenstorfer, Alemania; grado técnico)
- 4-Nonilfenol Etoxilato (4-NFE; Dr. Ehrenstorfer, Alemania; grado técnico)
- 4-Octilfenol Etoxilato (4-OFE; Dr. Ehrenstorfer, Alemania; grado técnico)
- 4-tert-Octilfenol (4-t-OF; Supelco; EE.UU.; 99,4% pureza)
- Tribromo-Anisol (TBA), como estándar interno.

### 2.1.4. Material de vidrio\*

- Jeringas Hamilton 10, 100 y 1000 mL
- Matraces Erlenmeyer 50, 100 mL
- Viales ámbar con tapa 30 y 60 mL
- Columnas de secado
- Matraces de aforo de 2, 5, 10, 50, 100 y 250 mL
- Viales ámbar de 1,8 mL con *liner* de teflón
- Vasos precipitados 10,50 y 100 mL
- Pipetas aforadas 1, 5, 10 mL

\*Todo el material de vidrio fue lavado con detergente libre de etoxilatos de alquilfenol, Extran® alcalino.

### **2.1.5. Muestras**

Biosólidos provenientes de la planta de tratamiento El Trebal extraídos el año 2008. Se realizó un muestreo de biosólidos provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas El Trebal de la Región Metropolitana. Las muestras corresponden a lodos dispuestos en enero de 2008 en el monorrelleno de la planta. El lodo fue secado al aire, molido y tamizado a 2 mm, determinándose su contenido de humedad para posteriormente expresar las determinaciones en base seca. El biosólido fue almacenado a baja temperatura (-18°C) para evitar la degradación de los analitos.

Se colectó una muestra compuesta del suelo agrícola Chada, clasificado como Mollisol a una profundidad de 0 a 20 cm, en la Región Metropolitana.

### **2.1.6. Reactivos**

- Agua milliQ con resistividad de 18,2MΩ.cm a 25°C.
- Extran Alcalino ®
- Gas de purga N<sub>2</sub> extra puro 99,999%, AGA.
- Nonilfenol técnico. ALDRICH®, CAS 84852-15-3.

### **2.1.7. Semillas**

- Trigo (*Triticum Aestivum*)

### **2.1.8. Solventes**

- Acetato de etilo, Merck, grado HPLC.
- Acetona grado técnico, Heyn.
- Acetona, Merck, grado HPLC.
- Ácido fórmico, Merck, grado HPLC.
- Diclorometano, Fisher Scientific, grado HPLC.
- Dietil éter, Merck, grado HPLC.
- Metanol, Merck, grado HPLC.
- n-Hexano 95%, Fisher Scientific, grado HPLC.
- Tolueno, Merck, grado HPLC.

## **2.1. Métodos**

### **2.2.1. Elección de analitos**

Para el estudio de biodisponibilidad se seleccionaron los siguientes analitos: 4-t-OF, 4-NF, 4-n-OF, 4-OFE y 4-NFE. La selección se realizó considerando que este grupo de etoxilatos son ampliamente utilizados en la fabricación de productos de limpieza tanto domésticos como industriales, así como en la elaboración de otros productos. Por otra parte estos etoxilatos son precursores de alquilfenoles, los que han sido clasificados como disruptores endocrinos (Peng, X. y col., 2007) y se encuentran habitualmente en una matriz como los biosólidos.

### **2.2.2. Caracterización cromatográfica GC-MS**

Para la cuantificación e identificación de los analitos se utilizó un equipo GC-MS con las siguientes condiciones optimizadas:

- Columna: HP5 (30 m, ID 0,25 mm)
- Gas de flujo: Helio
- Modo de inyección: Splitless
- Volumen de inyección: 1  $\mu$ L
- Temperatura del inyector:
- Temperatura de inicio: 100 °C

- Rampa: 10 °C/min
- Temperatura final: 280 °C

Bajo las condiciones anteriormente descritas se obtuvo el siguiente orden de elusión para cada analito, así como las masas características de cada uno, con sus abundancias relativas.

**Tabla 4: Caracterización cromatográfica de los alquilfenoles seleccionados**

<b>Analito</b>	<b>Tiempo de retención (mín.)</b>	<b>Masas características</b>	<b>Abundancia relativa de iones</b>
4-t-OF	10,329	135/136/107	10/0,9/1,5
4-NF	11,431-12,065	135/107/121	10/3,4/2
4-n-OF	12,182	107/108/206	10/1/0,7
4-OFE	13,301	179/135/107	10/9/2,5
4-NFE	14,336-14,836	179/135/107	10/9,5/4,3

En el ANEXO I se muestra los cromatogramas y los espectros de masa correspondientes para cada analito.

### **2.2.3. Obtención y caracterización de biosólidos y suelo**

El biosólido (B) se obtuvo de un muestreo realizado en enero de 2008, en la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas El Trebal, comuna de Padre Hurtado, provincia de Talagante, Región Metropolitana. El biosólido y el suelo fueron posteriormente secados



y homogenizados para su utilización, esto es, fueron secados al aire, molidos y luego tamizados a un tamaño de 2 mm. Se determinó su contenido de humedad para luego expresar los resultados sobre base seca. Además se determinaron diversas propiedades físicas y químicas para caracterizar las propiedades del biosólido y el suelo. Para el biosólido y el suelo se determinó materia orgánica, C orgánico oxidable, pH (H<sub>2</sub>O) 1:25 (p/v), N total, P total, CIC, CE, además de la textura del suelo. Todas las determinaciones realizadas en las caracterizaciones fueron realizadas según los procedimientos descritos en "Métodos de Análisis Recomendados para los Suelos de Chile Revisión 2006" (Sadzawka R. y col., 2006). Finalmente los biosólidos se conservaron a -18°C para evitar la degradación de los analitos.

#### **2.2.4. Enriquecimiento de biosólido con NF**

Con el objetivo de obtener un biosólido con alto contenido de NF que represente las condiciones de mayor concentración encontradas en las referencias se enriqueció una cantidad de biosólido (B) con Nonilfenol técnico. Para esto se utilizó como solvente acetona grado HPLC, en la cual se disolvieron completamente 1506 mg de NF, solución que luego se adicionó a 1 kg de biosólido. La mezcla se homogenizó utilizando un agitador mecánico hasta la evaporación total del solvente. De esta forma se obtuvo dos biosólidos distintos dependiendo del contenido de NF de cada uno. Se denominó B al biosólido sin enriquecer y BE al biosólido que fue fortificado con NF.

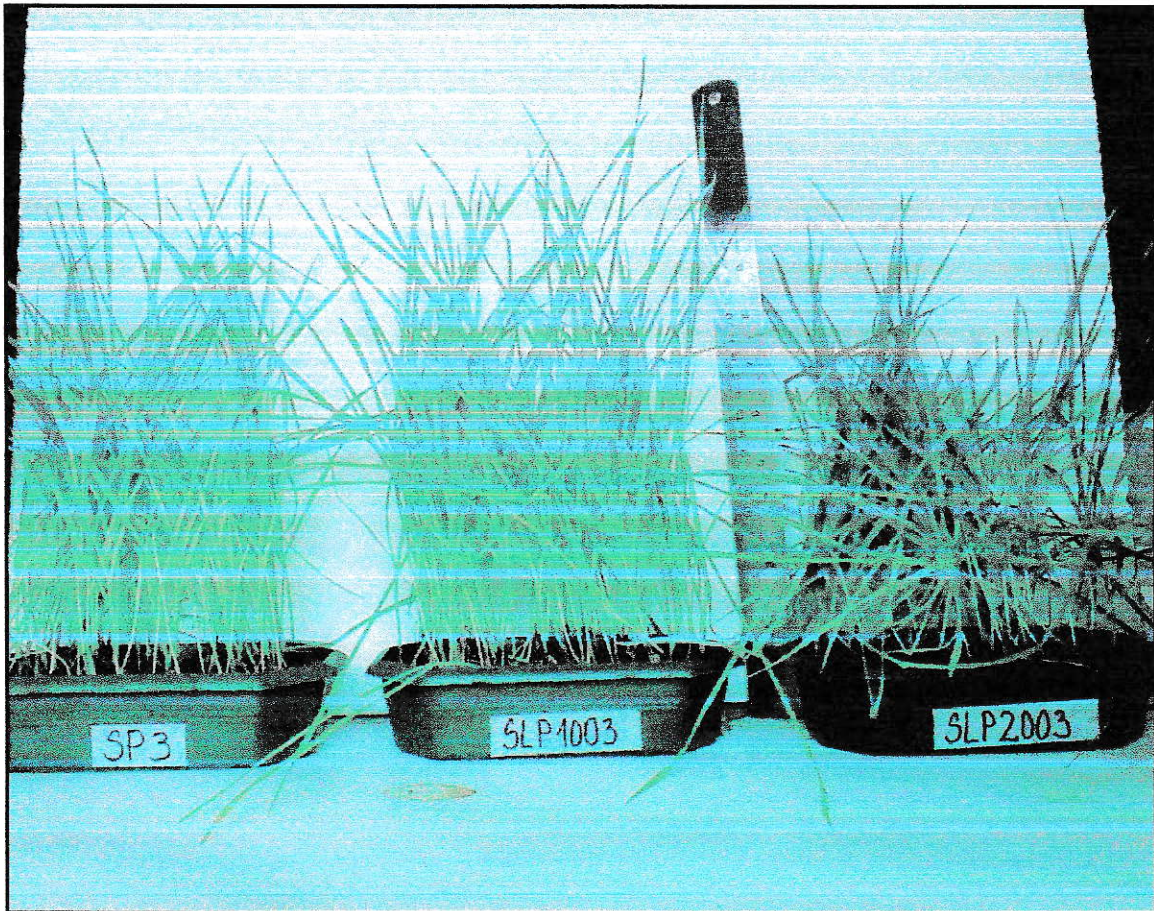
### 2.2.5. Ensayo con plantas de trigo

Se realizaron dos ensayos con cultivo de trigo en el laboratorio utilizando dos dosis de biosólido (B) en cada uno, 100 Mg/ha (B100) y 200 Mg/ha (B200), para esto se calculó la cantidad equivalente de suelo y biosólido necesario, procedimiento que se detalla en el ANEXO II. En el primer ensayo se utilizó biosólido sin enriquecer y en el segundo se utilizó el biosólido enriquecido (BE) con NF. Se utilizó suelo Chada (S) y semillas de trigo (*triticum aestivum*). Se realizó cada tratamiento en duplicado, incluyendo los correspondientes controles sin biosólido, parte de uno de los cultivos se muestra en la Figura 3.

Se mezcló y homogenizó suelo con la cantidad correspondiente de biosólido para cada tratamiento permitiendo un periodo inicial de estabilización de una semana. Luego de esta etapa se sembraron 100 semillas de trigo en 200 g. de suelo con biosólido según la dosis que correspondiera a cada tratamiento, todos los tratamientos se mantuvieron durante 35 días para permitir un crecimiento adecuado de las plantas, tiempo durante el cual se les aplicó artificialmente un fotoperíodo de 8 h. al día y se procuró mantener en todos los tratamientos las condiciones de humedad adecuadas a capacidad de campo. Capacidad de campo corresponde al porcentaje de agua que un suelo es capaz de retener luego de haber sido saturado con ella y drenado por efecto de la tensión del suelo seco que se encuentra debajo de él.

Al cabo de los 35 días, se dio por terminado el periodo de cultivo y en todos los tratamientos las plantas fueron separadas en parte aérea y raíz. Ambas partes fueron

lavadas con agua destilada para eliminar los restos de suelo y lodo y fueron congeladas a 4°C antes de aplicarles el proceso de liofilización descrito más adelante.



**Figura 3:** Cultivo de trigo en invernadero para determinación de biodisponibilidad de etoxilatos de alquilfenol y alquilfenoles. En la fotografía se muestran algunas de las plantas de trigo al final del periodo de cultivo, antes de ser retiradas y liofilizadas.

### **2.2.6. Metodología de extracción**

Se utilizaron dos métodos diferentes de extracción. Ambos empleando extracción presurizada con un equipo ASE100. Se hizo la distinción entre dos tipos de muestras; por una parte las muestras de plantas y por otra las muestras de suelo, biosólido y suelo con distintas dosis de biosólido, las condiciones de extracción según el tipo de muestra se detallan a continuación.

#### **2.2.6.1. Extracción en plantas de trigo.**

Todas las muestras vegetales una vez terminado el periodo de cultivo fueron lavadas con agua destilada y luego fueron sometidas a liofilización para eliminar el contenido de humedad en ellas sin descomponer los analitos mediante el uso de calor. Las muestras fueron congeladas a 4°C antes de ser liofilizadas (liofilizador L101, Liobras), proceso que se lleva a cabo en 72 horas. Para esto fue necesario congelar las muestras a -80°C, antes de ser incorporadas al liofilizador. Durante la liofilización las muestras permanecen a -40 °C y a una presión de 500 mm Hg.

Una vez obtenidas las muestras secas, con el objetivo de obtener una mayor superficie de contacto entre los tejidos vegetales y el solvente de extracción, las plantas fueron molidas y homogenizadas utilizando un molinillo eléctrico.

Para el proceso de extracción se emplearon las condiciones utilizadas para material vegetal descritas por Devin-Clarke D. y Brown, S. (2008), en un equipo ASE 100®, donde se utilizó como solvente de extracción una mezcla de diclorometano/acetona

(80/20 v/v), una presión de extracción de  $1650 \pm 50$  psi y una temperatura de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  en dos ciclos de extracción consecutivos de 60 min. cada uno. Cada celda de extracción fue cargada con un filtro de celulosa en el fondo, 0,25 g de muestra vegetal y una masa equivalente de tierra de diatomea como dispersante en una celda extracción de 10 mL. Terminado el proceso de extracción se realizó un procedimiento de limpieza de los extractos (Clean up) el cual se describe más adelante.

#### **2.2.6.2. Extracción en suelo con distintas dosis de biosólido.**

Se implementó las condiciones de extracción exhaustiva optimizadas para alquilfenoles en biosólido descritas por Marican, A. (2008), en un equipo ASE 100®, donde se utilizó como solvente de extracción acetona, una presión de extracción de  $1650 \pm 50$  psi y una temperatura de  $129\text{ }^{\circ}\text{C}$  en dos ciclos de extracción consecutivos de 34 min. cada uno. Cada celda de extracción fue cargada con un filtro de celulosa en el fondo, 0,5 g de muestra y una masa equivalente de tierra de diatomea como dispersante en una celda extracción de 10 mL. Terminado el proceso de extracción se realizó un procedimiento de limpieza de los extractos (Clean up) el cual se describe más adelante.

### 2.2.6.3. Extracción ASE (ensayo biomimético)

Se realizaron extracciones de biosólido (B) y biosólido enriquecido (BE) en las dosis 100 Mg/ha (B100) y 200 Mg/ha (B200), en un equipo ASE 100®. Como solvente de extracción se utilizó agua destilada, una presión de extracción de  $1650 \pm 50$  psi, a una temperatura de 200 °C en ciclos de extracción de 5 min. cada uno. Cada celda de extracción fue cargada con un filtro de celulosa en el fondo, 5 g de muestra y una masa equivalente de tierra de diatomea como dispersante en una celda extracción de 10 mL. Cada fracción fue recibida en una botella con 30 mL de diclorometano para evitar que al enfriarse el agua después de la extracción se insolubilizaran los analitos. Posteriormente se realizó una extracción liquido-liquido. Luego los extractos fueron concentrados en flujo de N<sub>2</sub> y sometidos a limpieza antes de ser inyectados en el cromatógrafo.

### 2.2.7. Metodología de secado y limpieza de extractos (clean up).

Una vez obtenidos los extractos se procede a realizar un secado de éstos a través de una columna de vidrio rellena hasta 10 cm de altura con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> activado. Los extractos posteriormente son concentrados en una corriente de N<sub>2</sub> hasta un volumen de 1 mL. El procedimiento de limpieza para eliminar las interferencias en las señales de los analitos, se realizó en un sistema de vacío *Manifold* (Visiprep, Supelco) según se explica en los puntos a continuación, dependiendo del tipo de extracto. Posteriormente a la limpieza de extractos se realizó una reducción de volumen en flujo de N<sub>2</sub> hasta casi sequedad y finalmente se realizó un cambio de solvente con 30 mL de

MeOH, los que fueron concentrados nuevamente en flujo de N<sub>2</sub> a un volumen final de 1mL.

#### **2.2.7.1. Limpieza de extractos de biosólido y suelo.**

Una vez obtenidos los extractos concentrados correspondientes a las distintas dosis de biosólidos aplicados, éstos se secaron en una columna de sulfato de sodio activado acondicionada previamente con acetona grado HPLC. Posteriormente se les hizo la limpieza previa a la inyección en el cromatógrafo. Esta limpieza se hizo utilizando el sistema de vacío *Manifold*, para esto primeramente se relleno una columna de limpieza con 5 g óxido de aluminio y se acondicionó con 40 mL de una solución de acetato de etilo/tolueno (3:1) que fue descartada. Luego se adicionó el extracto a la columna y los analitos fueron eluidos con 10 mL de dietil éter/metanol/ácido fórmico (1:1:0,05) y colectados en viales ámbar. (Meesters, 2002)

#### **2.2.7.2. Limpieza de extractos de plantas.**

Una vez obtenidos los extractos de plantas de trigo, se les hizo una limpieza previa a la inyección en el cromatógrafo, utilizando el mismo sistema de vacío mencionado antes. Para esto primeramente se relleno la columna con 2,5 g de óxido de aluminio activado al fondo de la columna y 3,5 g de sulfato de sodio activado sobre éste. Luego se acondicionó con 15 mL de hexano que fueron descartados y se adicionó el extracto a la columna que fue eluido con 30 mL de diclorometano/acetona (1:1), lo que fue

colectado en viales ámbar. Esta metodología de limpieza fue realizada de acuerdo a la descrita por Devin-Clarke D. y Brown, S. (2008).



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis previos

Se hizo una serie de determinaciones químicas y cromatográficas previas a los experimentos propios de este trabajo. Estas determinaciones consisten en la caracterización química del suelo y biosólido utilizados en los experimentos. Por otra parte se prepararon curvas de calibración multiestándar para los analitos seleccionados y se validó el método de limpieza de extractos. Todos los puntos mencionados se detallan a continuación.

##### 3.1.1. Caracterización química de suelo y biosólido

Tabla 5: Caracterización de suelos y biosólidos

Determinación	Unidad	Suelo Chada (S)	Biosólido (B)
pH-H <sub>2</sub> O (1:2,5)	-	7,83	7,09
pH-KCl	-	7,35	6,75
CE (1:5)	dS/m	0,37	4,92
CE (extracto de saturación)	dS/m	2,21	14,1
MO total (calcinación 450 °C)	%	5,46	53,6
MO oxidable	%	4,57	35,0

(Sadzawka y col., 2006.)

En la Tabla 5 se muestran las características químicas determinadas en las muestras de suelo y biosólido. Las mediciones de pH-H<sub>2</sub>O (1:2,5), que corresponden a la acidez activa o actual, representa la cantidad de iones H<sup>+</sup> libres en equilibrio en la fase líquida del suelo o biosólido. En este caso resulta ser superior en el suelo Chada (S) con respecto a lo observado en el biosólido (B). El pH-KCl por otra parte corresponde a la acidez potencial o intercambiable que resulta de las formas de aluminio fácilmente intercambiables con iones K<sup>+</sup>. Esta medición suele ser 0,5 a 1,0 inferior a pH-H<sub>2</sub>O (1:2,5), tal como se observa para las muestras de suelo y biosólido. Ambas mediciones sin embargo se encuentran en un rango considerado neutro donde el suelo (S) muestra un pH levemente más básico.

La conductividad eléctrica del suelo o biosólido es una estimación muy precisa del contenido de iones solubles existentes. Esta determinación sin embargo es dependiente del contenido de agua en la muestra. Es por esto que la conductividad CE (1:5) es considerablemente menor que la obtenida mediante el extracto de saturación, siendo esta última la referencia más utilizada. Los valores de CE mostrados en la Tabla 5, muestran un valor mucho mayor para el biosólido con respecto al suelo, indicando un contenido de sales mayor lo cual es coherente con lo encontrado generalmente en estas muestras. En este mismo sentido es posible observar en la Tabla 5 como el contenido de materia orgánica es ampliamente superior en el caso del biosólido (B), lo cual concuerda con las características que hacen del biosólido una buena alternativa como enmienda orgánica por el alto contenido de micro y macro nutrientes que contiene.

### 3.1.2. Determinación de humedad en suelo, biosólido y mezclas

Siguiendo la metodología establecida en “Métodos de Análisis Recomendados para los suelos de Chile Revisión 2006” (Sadzawka R. y col. 2006), se determinó el contenido de humedad en suelo, biosólido y mezclas utilizadas durante la investigación, Las cuales se realizaron en duplicado y cuyo promedio se muestra a continuación en la Tabla 6.

**Tabla 6: Determinación de humedad en las muestras**

Muestra	Agua (%)	fh
S	2,67	1,03
B	10,45	1,10
B100	13,48	1,13
B200	15,43	1,15
BE100	16,70	1,17
BE200	15,65	1,16

S: suelo Chada

B: biosólido El Trebal

B100: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg/ha

B200: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg/ha

BE100: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 100 Mg/ha

BE200: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 200 Mg/ha

Las determinaciones de humedad se realizaron en duplicado y con una exactitud de 0,01 g obteniendo desviaciones estándar (sd) inferiores a este valor por lo cual estas

no se informan en la tabla. Es posible observar en la misma tabla que el biosólido (B) tiene un contenido de humedad bastante mayor que el observado en el suelo (S), lo cual se manifiesta luego en la humedad medida en las muestras de mezclas de suelo-biosólido (B100 y B200) y suelo-biosólido enriquecido con NF (BE100 y BE200).

### 3.1.3. Curvas de calibración

Considerando la diversidad de las matrices a determinar, para la calibración se preparó una curva de calibración con soluciones multiestándar de los cinco analitos seleccionados en un amplio rango de concentración que va desde 0,01mg/L a 100 mg/L. Como solvente para la preparación de cada multiestándar se utilizó metanol (grado HPLC). A continuación se muestran las curvas de calibración utilizadas en la cuantificación en cada uno de los analitos.

**Tabla 7: Curvas de calibración de los diferentes analitos seleccionados.**

<b>Analito</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
<b>4-t-OF</b>	0,3692	-0,0401	0,9998
<b>4-NF</b>	0,1381	-0,0731	0,9994
<b>4-n-OF</b>	0,3734	-0,1281	0,9975
<b>4-OFE</b>	0,1885	-0,1076	0,9994
<b>4-NFE</b>	0,0446	-0,425	0,9977

Como se muestra en la Tabla 7, los valores de r<sup>2</sup> de las curvas de calibración de cada uno de los analitos, tuvieron valores cercanos a 1 indicando una alta correlación entre

las áreas obtenidas de los cromatogramas y las concentraciones de los analitos en cada estándar. Los cromatogramas correspondientes a cada uno de los analitos se muestran en el ANEXO I, así como los espectros de masa de cada uno.

#### **3.1.4. Determinación de límites de detección y cuantificación instrumentales**

El establecimiento del límite de detección de un método resulta frecuentemente controvertido y existe una variada descripción de métodos, tanto empíricos como estadísticos, para su obtención. En general se han utilizado dos criterios. El primero de ellos, basado en la definición convencional, que lo establece como la concentración de analito que proporciona una señal igual a tres veces la desviación estándar de la señal del blanco, consiste en medir diez repeticiones de la señal de una solución que contenía los analitos, en una cantidad cercana al límite de detección esperado. Sin embargo debido a la dificultad para medir señales de un blanco en un método cromatográfico esta técnica no es adecuada en este caso. El segundo criterio empleado, derivado del análisis estadístico de la curva de calibración, tiene en cuenta el error o desviación estándar de la regresión lineal aplicada, y fue esta metodología la que se adoptó para el cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales.

Se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales inyectando 9 multiestándares ( $n = 9$ ) en un rango con baja concentración

(5 µg/L - 700 µg/L) y aplicando los correspondientes ajustes lineales cuyos parámetros se muestran en la Tabla 8.

Las ecuaciones correspondientes al cálculo del LD y LC instrumentales se muestran en el ANEXO 3.

**Tabla 8: Determinación de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) instrumentales.**

	<b>4-t-OF</b>	<b>4-NF</b>	<b>4-n-OF</b>	<b>4-OFE</b>	<b>4-NFE</b>
<b>m</b>	0,47109	0,15756	0,45406	0,17196	0,03145
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99781	0,9992	0,99825	0,99823	0,99746
<b>sd</b>	0,00834	0,00168	0,00719	0,00274	0,0006
<b>LD [µg/L]</b>	50	30	44	45	54
<b>LC [µg/L]</b>	166	100	148	149	178

Como es posible apreciar, tanto el LD como LC calculados se encuentran en el orden de los µg/L, límites que son satisfactorios para las concentraciones encontradas en los extractos concentrados tanto de muestras de plantas como de suelo y biosólido, todas las cuales se encontraron por sobre el límite de detección de cada uno de los analitos determinados. Los valores de R<sup>2</sup> para cada uno de los ajustes obtenidos son todos cercanos a uno y satisfactorios para la cuantificación adecuada de los analitos en los extractos.

### 3.1.5. Influencia de la limpieza de extractos en la recuperación de los analitos

Se aplicaron las técnicas de limpieza de extractos a soluciones multiestándar (ver parte experimental) de la misma forma que se hizo con las muestras reales de plantas, suelo o biosólido. Las determinaciones se realizaron en duplicado. El objetivo fue validar el método de limpieza, comprobar su efectividad y determinar cómo influye la técnica de limpieza en la recuperación de los analitos. Los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos analitos se muestran en la Tabla 9 y 10 a continuación:

**Tabla 9: Validación del método de limpieza extractos de plantas.**

Analito	Concentración estándar (mg/L)	Concentración recuperada promedio (mg/L)	±sd (mg/L)	Recuperación (%)	±sd rel. (%)
4-t-OF	5,22	3,17	0,06	60	1
4-NF	5,27	7,2	0,2	136	5
4-n-OF	5,22	5,6	0,3	108	7
4-OFE	5,57	6,2	0,3	105	6
4-NFE	5,91	6,13	0,01	110,0	0,1

n=2

**Tabla 10: Validación del método de limpieza extractos de biosólido.**

<b>Analito</b>	<b>Concentración estándar (mg/L)</b>	<b>Concentración recuperada promedio (mg/L)</b>	<b>±sd (mg/L)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>±sd rel. (%)</b>
<b>4-t-OF</b>	2,01	1,91	0,02	95	2
<b>4-NF</b>	2,06	2,20	0,05	106,7	0,6
<b>4-n-OF</b>	1,96	2,08	0,08	106	4
<b>4-OFE</b>	2,08	2,17	0,06	104	1
<b>4-NFE</b>	2,00	2,16	0,04	108	1

n=2

Las recuperaciones obtenidas luego de aplicar la metodología de limpieza de extractos correspondiente resultaron satisfactorias. Para la mayoría de los analitos la recuperación fue alrededor del 100%.



### 3.2. Contenido total de alquilfenoles en las muestras

Se determinó el contenido total de los alquilfenoles seleccionados en las muestras de suelo Chada, biosólido y en las mezclas de suelo con biosólido en las dosis de 100 Mg/ha (B100) y 200 Mg/ha (B200). Para esto se realizaron extracciones exhaustivas optimizadas como se describe en *Materiales y métodos*. Los resultados de las extracciones se muestran a continuación en la Tabla 11.

**Tabla 11: Concentración total de alquilfenoles en muestras de suelo y biosólido expresada en mg/kg.**

Muestra	4-t-OF	±sd	4-NF	± sd	4-n-OF	± sd	4-OFE	± sd	4-NFE	± sd
S	0,05	0,02	0,9	0,4	0,090	0,001	0,11	0,01	0,8	0,4
B	2,29	0,08	327	49	32,8	0,5	0,80	0,04	963	44
B100	0,17	0,02	16,9	0,6	0,8	0,1	0,21	0,04	18,5	0,4
B200	0,3	0,1	28,2	0,7	1,0	0,9	0,21	0,03	28,9	0,7

n=2

S: suelo Chada

B: biosólido El Trebal

B100: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg·ha<sup>-1</sup>

B200: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg·ha<sup>-1</sup>

El biosólido (B) además fue enriquecido con 1500 mg/kg de nonilfenol técnico, obteniendo un biosólido enriquecido (BE) con una concentración total para este analito de:

**BE: 2688 ± 333 mg/kg de 4-NF**

La concentración final del biosólido enriquecido con 4-NF es mayor que la concentración máxima de 4-NF encontrada normalmente en biosólidos (1500 mg/kg) (Devin-Clarke y col. 2008), sin embargo representa un escenario posible dependiendo del tipo y procedencia del biosólido. Por otra parte, se utilizó esta concentración alta en comparación con el biosólido sin enriquecer (B) de NF, para observar claramente la eventual asimilación de este compuesto por las plantas. La concentración del resto de los analitos permaneció invariable en el biosólido enriquecido (BE) con 4-NF con respecto al biosólido sin enriquecer (B).

Cabe destacar la importancia del alto contenido de 4-NFE encontrado en el biosólido. Esto ya que las distintas vías de eliminación de de este etoxilato derivan en su descomposición a NF, aumentando así varias veces la concentración de este último a medida que ocurre la degradación de 4-NFE (Nuñez, L. y col. 2007) De esta forma pudiendo alcanzar altas concentraciones de NF al estabilizarse el biosólido, tal como la concentración del biosólido enriquecido (BE) con NF que se preparó.

De la misma forma que con el biosólido sin enriquecer, se realizaron tratamientos con distintas dosis del biosólido enriquecido con 4-NF (BE). La concentración final de 4-NF en las mezclas suelo-biosólido enriquecido en las dosis correspondientes de 100 Mg/há (BE100) y 200 Mg/há (BE200), se muestran a continuación en la Tabla 12.

**Tabla 12: Concentración total de 4-NF en dosis de biosólido enriquecido (BE) expresada en mg/kg.**

<b>Extracto</b>	<b>4-NF</b>	<b>±sd</b>
<b>BE100</b>	74	1
<b>BE200</b>	167	1

n=2

BE100: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de  $100 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$

BE200: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de  $200 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$

### **3.3. Ensayo de biodisponibilidad de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenoles utilizando como indicador plantas de trigo.**

A continuación se muestran los resultados del primer ensayo con trigo en el cual se hizo germinar semillas en suelo con distintos tratamientos. Estos tratamientos consisten en la aplicación de distintas dosis de biosólidos, las cuales fueron 100 Mg/há (B100) y 200 Mg/há (B200), como se explicó previamente en la sección de métodos.

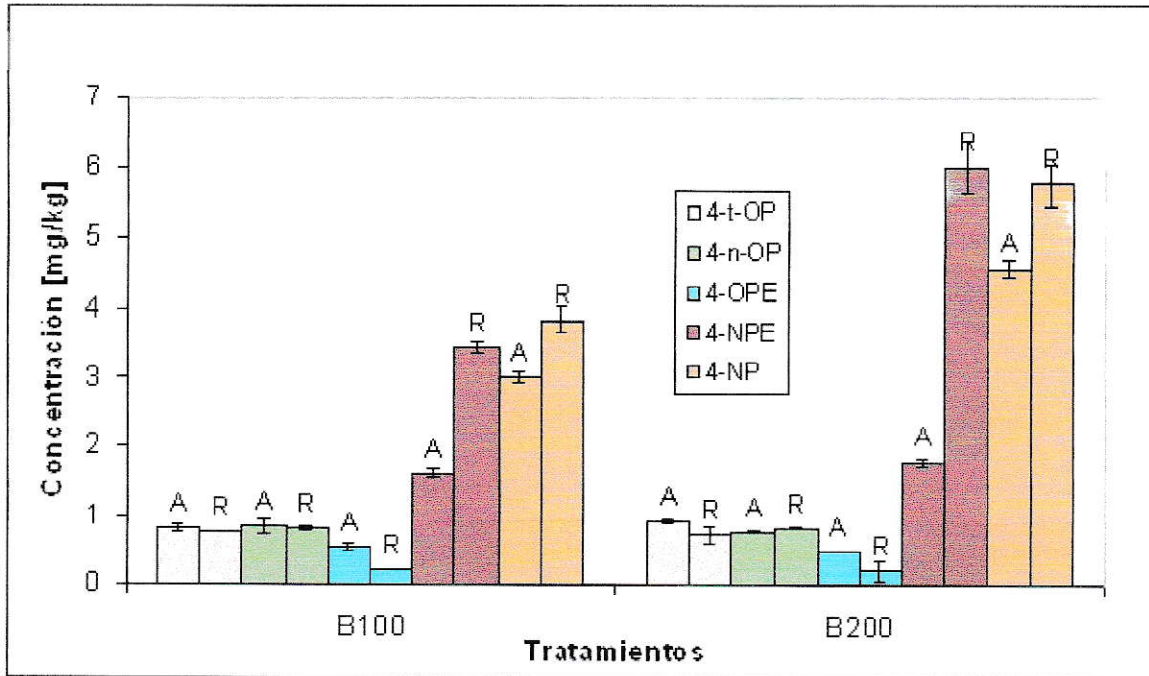
En la Tabla 13 y Tabla 14 se muestran las concentraciones encontradas para cada analito en plantas de trigo, tanto en raíz como en parte aérea. Se muestra los tratamientos B100 y B200 por separado. En estas tablas la *masa de analitos biodisponible* corresponde a la cantidad total de cada analito (masa) extraída en cada fracción de la planta (raíz o parte aérea). Esta se obtiene directamente de la multiplicación de la concentración de analito encontrada por la masa de la fracción vegetal (no informada), y entrega información sobre la masa de analito que acumula la planta durante el periodo de cultivo.

**Tabla 13: Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido (B) en dosis de 100 Mg/há.**

Analito	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]	Masa de analitos biodisponible (µg)	±sd (µg)
4-t-OF	aérea	0,80	0,05	0,94	0,06
	raíz	0,761	0,005	0,543	0,003
4-n-OF	aérea	0,8	0,1	0,9	0,1
	raíz	0,81	0,02	0,58	0,01
4-OFE	aérea	0,54	0,04	0,63	0,05
	raíz	0,210	0,009	0,150	0,006
4-NFE	aérea	1,60	0,06	1,87	0,07
	raíz	3,45	0,08	2,45	0,05
4-NF	aérea	3,00	0,07	3,51	0,08
	raíz	3,8	0,1	2,7	0,1

**Tabla 14: Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido (B) en dosis de 200 Mg/há.**

Analito	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]	Masa de analitos biodisponible (µg)	±sd (µg)
4-t-OF	aérea	0,91	0,02	1,22	0,03
	raíz	0,7	0,1	0,40	0,06
4-n-OF	aérea	0,77	0,01	1,03	0,01
	raíz	0,821	0,004	0,460	0,002
4-OFE	aérea	0,495	0,009	0,66	0,01
	raíz	0,2	0,1	0,11	0,08
4-NFE	aérea	1,77	0,05	2,38	0,07
	raíz	6,0	0,3	3,3	0,1
4-NF	aérea	4,5	0,1	6,1	0,1
	raíz	5,7	0,2	3,2	0,1



**Figura 4:** Contenido de alquilfenoles en trigo tratado con B100 (suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg/ha) y B200 (suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg/ha). A= parte aérea; R:=raíz.

En la Figura 4 se puede observar la influencia de la dosis de biosólido aplicada en cada tratamiento en la concentración de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol en el trigo después de 35 días de cultivo. En primer lugar se puede observar que los analitos 4-NFE y 4-NF muestran un aumento importante de concentración en el trigo o biodisponibilidad al aumentar la dosis de biosólido de 100 Mg/há (B100) a 200 Mg/há (B200), excepto con 4-NFE en la parte aérea, en que no se observa alguna diferencia considerable. Esto coincide con los resultados del contenido de alquilfenoles en el biosólido, mostrado en la Tabla 11 "Concentración total de alquilfenoles en muestras de suelo y biosólido en mg/kg", en donde estos analitos resultaron ser los más abundantes.

Por otra parte el cambio más considerable se produce en la raíz con el tratamiento B200, con el cual la concentración de 4-NFE aumenta superando incluso la concentración de 4-NF.

Se observa también en la Figura 4 que las concentraciones de 4-t-OF, 4-n-OF y 4-OFE prácticamente no se ven influenciadas por el aumento en la dosis de biosólido, manteniendo sus rangos de concentración inferiores a 1 mg/kg tanto en B100 como en B200 y sin mostrar prácticamente ninguna variación de concentración en los dos tratamientos aplicados. Esto sin embargo en el caso de 4-n-OF y 4-OFE probablemente se deba a que en suelo con biosólido B200 no hay un aumento significativo de concentración de estos analitos con respecto al suelo con biosólido B100 como se observa en la Tabla 11. A diferencia de lo observado para 4-t-OF en donde se hubiera esperado un aumento de concentración en el trigo en el tratamiento B200, producto de su aumento de concentración en el suelo con biosólido B200 con respecto a B100.

Se observó además que los analitos que se encuentran en menor concentración en el biosólido 4-t-OF, 4-n-OF y 4-OFE; en el trigo muestran una concentración superior en la parte aérea que en la raíz, siendo sin embargo baja la diferencia. Solamente en el caso de 4-n-OF con el tratamiento B200 se observa una concentración mayor en la raíz.

En el caso de los analitos 4-NFE y 4-NF, los cuales se encuentran en concentraciones mayores en el biosólido, se observan diferencias significativas en la concentración

observada en la raíz y la parte aérea. Se observaron siempre concentraciones mayores en la raíz que en la parte aérea, tanto en el tratamiento B100 como en B200, llegando a concentraciones de 4-NFE y 4-NF de hasta unos 6 mg/kg en raíz de trigo, Lo cual indicaría una mayor retención de los analitos en la raíz que en la parte aérea.

En términos generales podemos observar que efectivamente los cinco analitos seleccionados son absorbidos por el trigo en un rango de concentración de 0,2 a 6 mg/kg al utilizar dosis de biosólido (B) de hasta 200 Mg/há.

Al menos con 4-NFE y 4-NF se encontró que su concentración en la planta está directamente relacionada con la concentración que éstos tienen en el suelo según las distintas dosis de biosólido aplicadas.



**3.4. Ensayo de biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo con biosólido enriquecido.**

Se realizó un segundo ensayo con trigo de similares características del primero, utilizando el mismo tipo de semillas, pero utilizando el biosólido enriquecido con NF (BE). Se aplicaron los mismos tratamientos que en el primer cultivo tal como se describió previamente, esto es, dos dosis distintas de biosólido enriquecido equivalentes a 100 Mg/há (BE100) y 200 Mg/há (BE200).

**Tabla 15: Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido enriquecido con 4-NF (BE) en dosis de 100 Mg/há.**

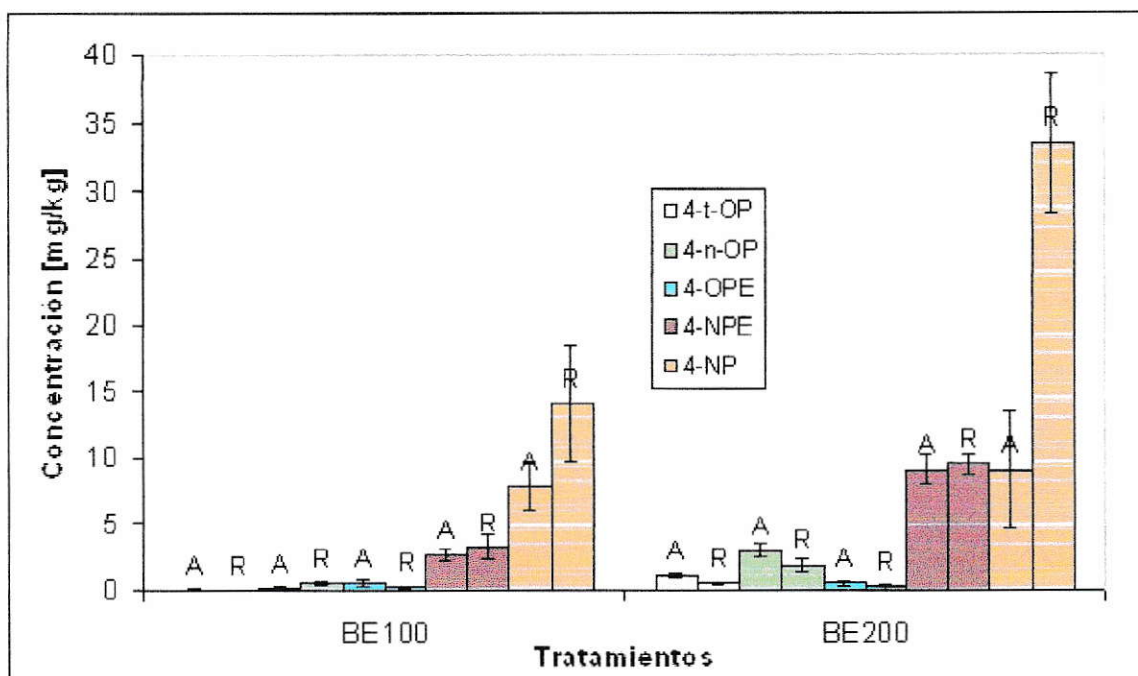
Analito	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]	Masa de analitos biodisponible (µg)	±sd (µg)
4-t-OF	Aérea	0,03	0,02	0,06	0,04
	Raíz	0,02	0,01	0,02	0,01
4-n-OF	aérea	0,19	0,08	0,3	0,1
	raíz	0,5	0,1	0,5	0,1
4-OFE	aérea	0,6	0,2	0,9	0,3
	raíz	0,09	0,09	0,09	0,09
4-NFE	aérea	2,6	0,3	4,2	0,5
	raíz	3,2	0,8	3,1	0,8
4-NF	aérea	7	1	12	2
	raíz	14	4	13	4

**Tabla 16: Biodisponibilidad de alquilfenoles en trigo cultivado con biosólido enriquecido con 4-NF (BE) en dosis de 200 Mg/ha.**

Analito	Parte	Concentración de analitos en trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]	masa de analitos biodisponible (µg)	±sd (µg)
4-t-OF	aérea	1,0	0,1	1,8	0,1
	raíz	0,49	0,08	0,36	0,06
4-n-OF	aérea	3,0	0,4	5,4	0,7
	raíz	1,8	0,5	1,3	0,3
4-OFE	aérea	2,1	0,2	3,8	0,4
	raíz	0,9	0,2	0,6	0,1
4-NFE	aérea	9	1	16	2
	raíz	9,5	0,7	7,1	0,5
4-NF	aérea	9	4	16	7
	raíz	33	5	25	3

En las Tablas 15 y 16 se muestra la concentración, de cada uno de los analitos seleccionados, que fue encontrada en trigo cultivado en suelo con biosólido enriquecido con NF. La parte aérea y raíz se muestran por separado. En la Tabla 15 se muestra las concentraciones correspondientes al tratamiento en que se aplicó 100 Mg/ha y en la Tabla 16 al con 200 Mg/ha.

La información contenida en las tablas anteriores se presenta gráficamente a continuación en la Figura 5. En esta figura se compara el efecto de la dosis de biosólido en el contenido de cada analito en el trigo cultivado.



**Figura 5:** Contenido de alquilfenoles en trigo tratado con BE100 (suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 100 Mg/ha) y BE200 (suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 200 Mg/ha).

A: parte aérea; R: raíz.

En la Figura 5, se puede observar la influencia de la dosis de biosólido enriquecido (BE) aplicada en cada tratamiento, en la concentración de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol en el trigo. Se observa que las concentraciones de todos los analitos aumentan junto con la dosis de biosólido aplicada en cada tratamiento, a excepción de 4-OFE que muestra prácticamente la misma concentración en ambos tratamientos.

Por otra parte al comparar los valores de concentración de los analitos 4-t-OP, 4-n-OF, 4-OFE y 4-NFE en trigo con tratamiento BE200, éstos muestran un aumento con respecto al encontrado en trigo con tratamiento B200. Esto a pesar de que la

concentración de estos analitos en el suelo con biosólido BE200 y B200 es prácticamente la misma en ambos tratamientos, como se muestra en la Tabla 11.

El analito 4-NF muestra un aumento importante de concentración en el trigo o biodisponibilidad al utilizar el biosólido enriquecido (BE) en los tratamientos con respecto a los tratamientos con biosólido (B), como se aprecia en la Figura 5. Este aumento se observa también entre los dos tratamientos con biosólido enriquecido B100 y B200. La diferencia es mucho más significativa en las concentraciones encontradas en la raíz, prácticamente duplicándose. En la parte aérea por otro lado 4-NF muestra un aumento pequeño en comparación con la raíz. Esto muestra como 4-NF se concentra preferentemente en la raíz mientras que la parte aérea prácticamente no muestra aumento entre BE100 a BE200.

Se observó además que los analitos que se encuentran en menor concentración en el biosólido 4-t-OF, 4-n-OF y 4-OFE; en el trigo muestran una concentración superior en la parte aérea que en la raíz, siendo sin embargo pequeña la diferencia. En el caso de los analitos 4-NFE y 4-NF, los cuales se encuentran en concentraciones mayores en el biosólido, se observa una concentración mayor en la raíz que en la parte aérea. Para 4-NF en el tratamiento con biosólido enriquecido (BE) en dosis de 200 Mg/ha se observa la mayor concentración de alquilfenol encontrada en trigo que corresponde a 33 mg/kg, mientras que en con la dosis de 100Mg/ha alcanza solo 14 mg/kg, lo que consecuentemente con la dosis aplicada corresponde aproximadamente a la mitad, como se observa en las tablas 15 y 16.

Se ha encontrado que 4-NF en la superficie del suelo puede ser fotodegradado más rápidamente que aquel que se encuentra fuera del alcance de la luz (Xia, K. y Yoon Jeoung, C. 2004) como por ejemplo el que está en contacto con las raíces o absorbido por ellas, así el 4-NF encontrado en la parte aérea de trigo está expuesto a la luz, a diferencia de aquel localizado en la raíz. En estas condiciones la fotodegradación podría explicar la menor concentración de este analito en la parte aérea de trigo.

En términos generales podemos observar que en el suelo con biosólido enriquecido (BE), los cinco analitos seleccionados son absorbidos por el trigo en un rango de concentración de 0,02 a 33 mg/kg y que estas son mayores que las observadas en el trigo cultivado con biosólido sin enriquecer (B).

Al menos con 4-NF se encontró, tanto en el biosólido enriquecido (BE) como en el biosólido sin enriquecer (B) que su concentración en la planta está directamente relacionada con la concentración que este alquilfenol tiene, en el suelo según las distintas dosis de biosólido aplicadas.

Como se indicó anteriormente la concentración de 4-t-OF, 4-n-OF, 4-OFE y 4-NFE en el biosólido enriquecido (BE) son las mismas que en el biosólido sin enriquecer (B), ya que éste fue enriquecido solamente con NF. Por este motivo el ensayo de biodisponibilidad que se realizó con el biosólido enriquecido (BE), solamente se considera la concentración 4-NF, incluyendo las concentraciones medidas previamente en el biosólido sin enriquecer (B).

La concentración de 4-NF en trigo, tanto en raíz como en parte aérea, en los cuatro tratamientos aplicados (B100, B200, BE100 y BE200) se muestran juntos a continuación en la Tabla 17 y en la Figura 6.

**Tabla 17: Biodisponibilidad de 4-NF en trigo, para distintas dosis de biosólido enriquecido con NF.**

Tratamiento	Concentración de 4-NF en parte aérea de trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]	Concentración de 4-NF en raíz de trigo [mg/kg]	±sd [mg/kg]
<b>B100</b>	3,00	0,07	3,8	0,1
<b>B200</b>	4,5	0,1	5,7	0,2
<b>BE100</b>	7	1	14	4
<b>BE200</b>	9	4	33	5

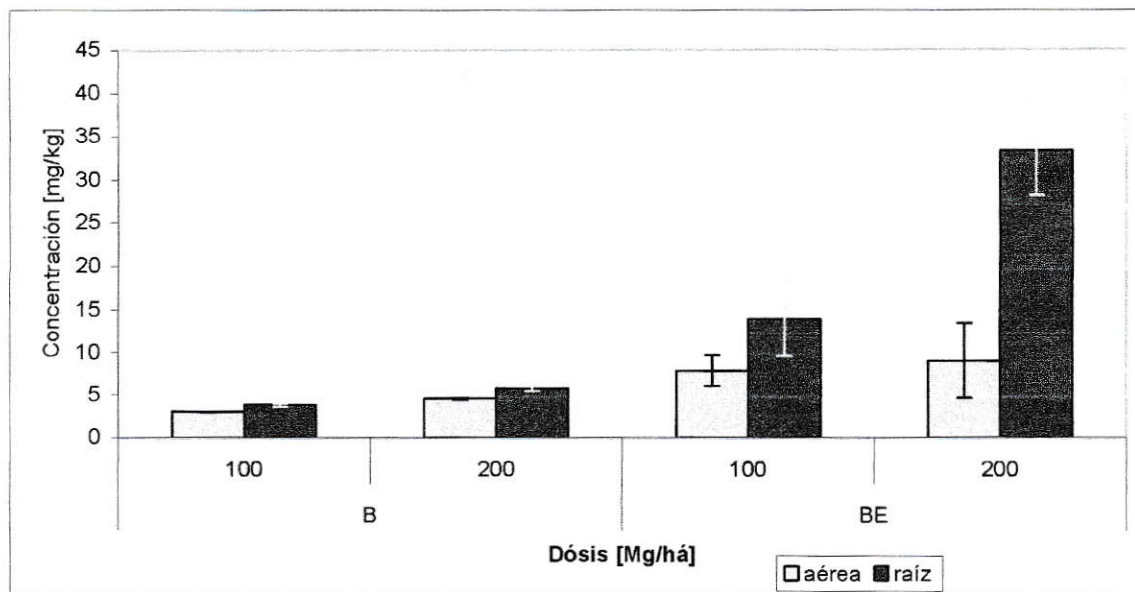
B100: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg·ha<sup>-1</sup>

B200: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg·ha<sup>-1</sup>

BE100: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 100 Mg·ha<sup>-1</sup>

BE200: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 200 Mg·ha<sup>-1</sup>

En la Figura 6, a continuación, es posible apreciar la tendencia de aumento de biodisponibilidad de 4-NF en trigo con respecto al aumento de la dosis de biosólido aplicada y al aumento de analito (4-NF) en el suelo con distintas dosis de biosólido y biosólido enriquecido.



**Figura 6:** Biodisponibilidad de 4-NF en parte aérea y raíz de trigo encontrada para los distintos tratamientos aplicados B100, B200, BE100 y BE200.

Observando los resultados obtenidos con respecto al contenido de alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol en trigo, se aprecia que 4-NF y su etoxilato 4-NFE son los analitos más abundantes en una matriz tal como la del biosólido. Asimismo se observa que nuevamente son estos dos analitos los que se encuentran en mayor concentración en el trigo que ha sido cultivado en suelo con distintas dosis de biosólido.

Es relevante entonces que 4-NFE y su producto de degradación 4-NF muestren altas concentraciones en biosólido en el trigo cultivado en suelo con biosólido, con respecto a otros alquilfenoles, ya que es este compuesto (4-NF) el que ha sido identificado como disruptor endocrino.

### 3.5. Ensayo biomimético

A continuación se muestran los resultados de la extracción biomimética que se realizó a los distintos tratamientos aplicados a los cultivos de trigo, B100, B200, BE100 y BE200.

Los ensayos de extracción biomimética se limitaron solamente a 4-NFE y su producto de degradación 4-NF, por la relación de ambas especies en lo que respecta a las vías de degradación, a que representan los alquilfenoles con mayor abundancia en el biosólido y por que 4-NF tiene especial importancia ambiental debido a su carácter de disruptor endocrino.

El objetivo de un método biomimético en este caso es relacionar la biodisponibilidad de 4-NFE y 4-NF encontrada en trigo en sus diferentes partes (raíz o parte aérea, mostrados en las Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16) con la concentración encontrada en los extractos de las mismas dosis de biosólido en que fue cultivado el trigo, según cada tratamiento (extracción biomimética ASE). Para esto se hicieron extracciones de las muestras de suelo con las distintas dosis de biosólido (B) y biosólido enriquecido (BE), a 200 °C. Los extractos fueron sometidos al procedimiento de limpieza y finalmente las concentraciones obtenidas de los extractos fueron correlacionadas con la biodisponibilidad encontrada en trigo. Dichos resultados de la extracción ASE se muestran a continuación en la Tabla 19.



**Tabla 18: Extracción biomimética ASE**

Muestra	Concentración extracción ASE (ug/kg) (200 °C)			
	4-NF	±sd	4-NFE	±sd
<b>B100</b>	25,6	0,2	29,8	0,8
<b>B200</b>	22	1	32	2
<b>BE100</b>	131	4	33,9	0,5
<b>BE200</b>	300	22	65	4

B100: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg/ha

B200: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg/ha

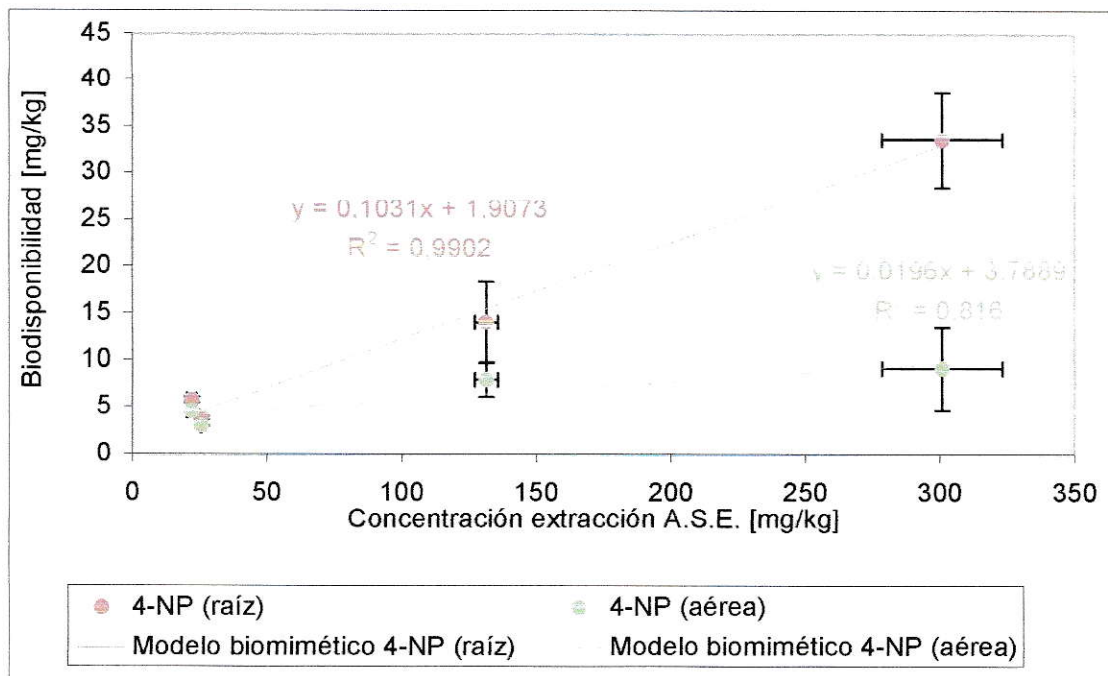
BE100: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 100 Mg/ha

BE200: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 200 Mg/ha

En la Tabla 18 se muestra la concentración de los extractos de suelo con distintas dosis de biosólido (B100 y B200) y biosólido enriquecido, (BE100 y BE200) para los analitos 4-NF y 4-NFE, obtenidos mediante la extracción biomimética ASE con agua presurizada a 200°C.

Contrastando la concentración de la extracción biomimética ASE con la biodisponibilidad de 4-NF y 4-NFE encontrada en las diferentes partes de trigo en la sección 4.4, se observa que en ambos casos la concentración de los analitos seleccionados se relaciona directamente con la dosis aplicada de biosólido tanto en el biosólido (B), como en el biosólido enriquecido (BE), como se esperaría. Con el objetivo de establecer la relación entre la biodisponibilidad de los analitos seleccionados y los resultados encontrados en la extracción biomimética ASE se

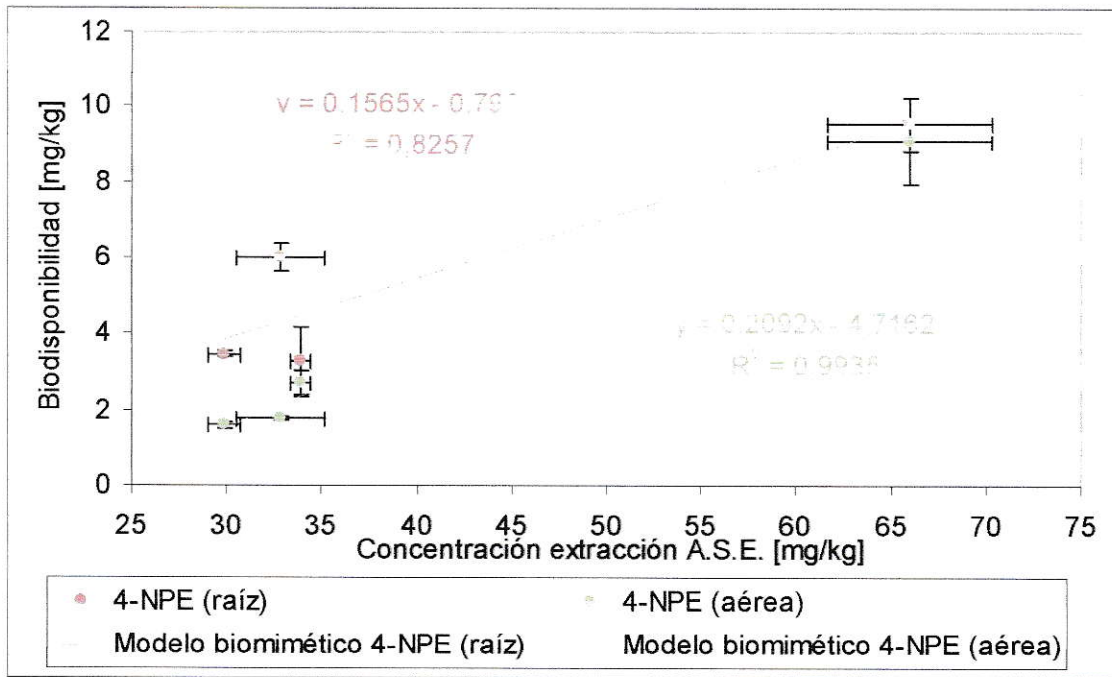
hicieron las correlaciones lineales correspondientes para cada analito y con la biodisponibilidad en raíz y parte aérea de trigo por separado. En la Figura 7 y Figura 8 a continuación se muestra las relaciones encontradas.



**Figura 7:** Regresión entre la biodisponibilidad de 4-NF en raíz y parte aérea de trigo y el resultado de la extracción biomimética A.S.E., para este analito. n=4.

En la Figura 7 se muestra las relaciones lineales encontradas entre biodisponibilidad de 4-NF en raíz y parte aérea de trigo y la concentración de este analito encontrada en los extractos obtenidos a través de la extracción biomimética ASE, tanto para la raíz como para la parte aérea. Para los extractos de raíz de trigo se obtuvo un  $R^2$  de 0,9902, indicando una significativa correlación entre la biodisponibilidad de 4-NF en raíz de trigo y el método biomimético de extracción. La biodisponibilidad

correspondiente a la parte aérea de trigo tuvo una correlación menor con la extracción biomimética A.S.E., con un  $R^2$  de 0,816.



**Figura 8:**-Biodisponibilidad de 4-NFE en raíz y parte aérea de trigo en función de la extracción biomimética ASE, para el mismo analito (n=4).

En la Figura 8 se muestra las relaciones encontradas entre biodisponibilidad de 4-NFE en raíz y parte aérea de trigo y la concentración de este analito encontrada en los extractos obtenidos a través de la extracción biomimética, en este caso el aplicado a los extractos de raíz de trigo resulto con un  $R^2$  de 0,8257, menor que el correspondiente a la parte aérea  $R^2$  de 0,9935 indicando una significativa correlación entre la biodisponibilidad de 4-NFE en la parte aérea de trigo y el método biomimético de extracción.

Los ajustes lineales (Modelos biomiméticos 4-NF y Modelo biomiméticos 4-NFE) de la Figura 7 y Figura 8 corresponden entonces a una posibilidad de método biomimético, la cual será validada a través del ensayo en plantas de trigo, para estimar la fracción efectivamente biodisponible de 4-NFE y 4-NF en suelo con distintas dosis de biosólido.

### **3.5.1 Validación de método biomimético de 4-NFE y 4-NF.**

A continuación se muestra en la Tabla 19 la biodisponibilidad de 4-NFE y 4-NF en la raíz y parte aérea de trigo, estimada utilizando los modelos biomiméticos establecidos anteriormente en la Figura 7 y Figura 8.

**Tabla 19: Valores estimados de biodisponibilidad utilizando método biomimético y su porcentaje con respecto a los valores reales.**

parte	Tratamiento	4-NFE		4-NF	
		Biodisponibilidad estimada [mg/kg]	%	Biodisponibilidad estimada [mg/kg]	%
raíz	B100	3,8	112	4,5	118
	B200	4	72	4	73
	BE100	4,5	138	15	110
	BE200	9	100	32	98
aérea	B100	1,5	96	4,2	143
	B200	2	121	4	92
	BE100	2,3	88	6	81
	BE200	9	100	9	106

B100: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 100 Mg/ha

B200: suelo + biosólido El Trebal en dosis de 200 Mg/ha

BE100: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 100 Mg/ha

BE200: suelo + biosólido El Trebal enriquecido con NF, en dosis de 200 Mg/ha

En la Tabla 19 se muestra la biodisponibilidad calculada mediante los modelos biomiméticos para 4-NFE y 4-NF tanto en la raíz como en la parte aérea. Los porcentajes que acompañan a los valores de biodisponibilidad corresponden al porcentaje que representa cada estimación según la biodisponibilidad real en cada caso, las cuales se muestran anteriormente en la Tabla 13, Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16.

Como se observa, los modelos biomiméticos establecidos para 4-NF y 4-NFE, permiten hacer una estimación de la biodisponibilidad que se aproxima a la biodisponibilidad real medida para cada analito tanto en la parte aérea como en la raíz del trigo, con

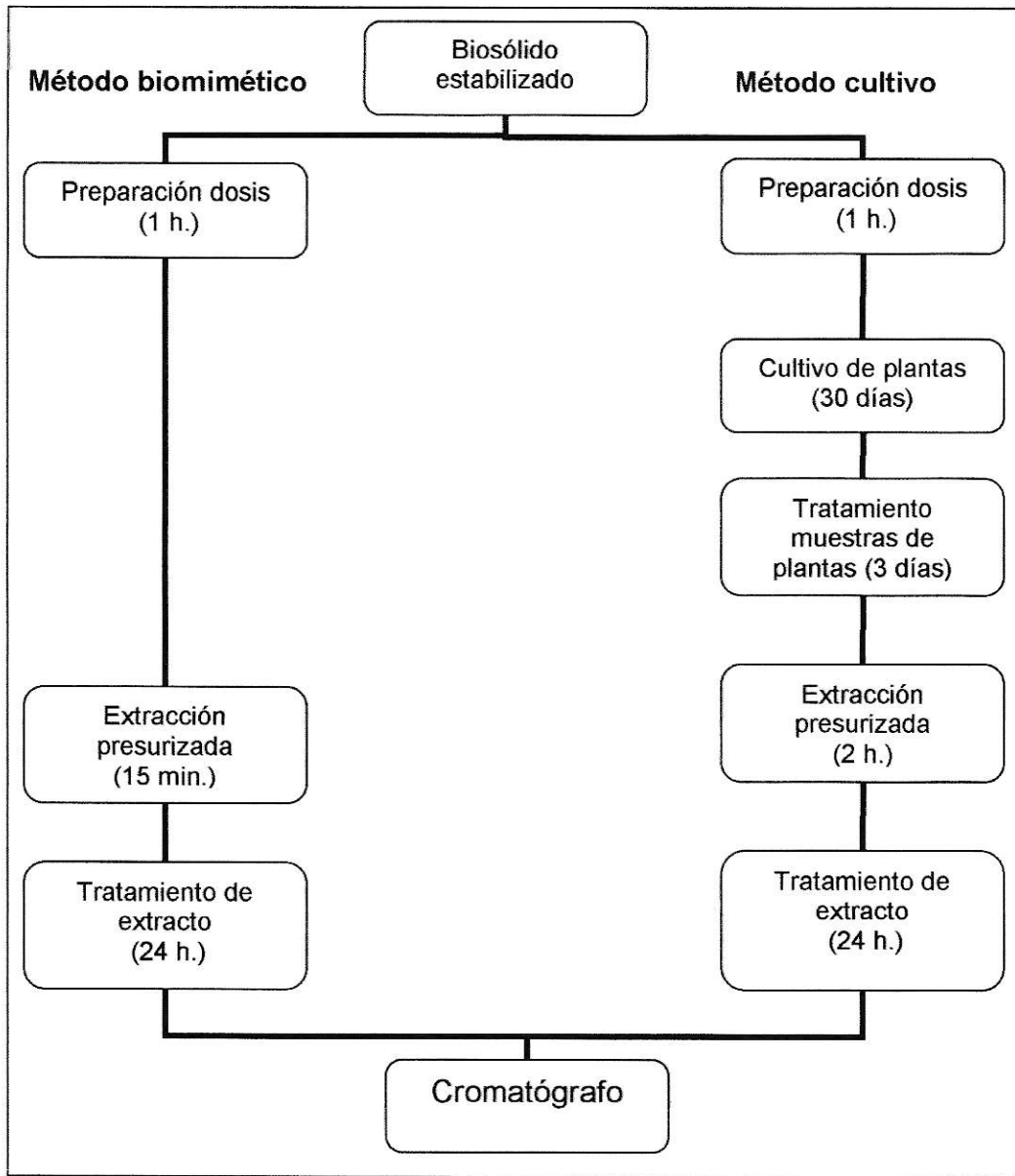
porcentajes promedio de 101% y 105% con respecto a la biodisponibilidad real de 4-NFE en parte aérea y raíz, respectivamente, y 105% y 99% con respecto a la biodisponibilidad real de 4-NF en parte aérea y raíz, respectivamente.

El método biomimético es comparativamente más expedito, sencillo y rápido que el ensayo con cultivo propiamente tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 9, a la vez, es más representativo de la fracción biodisponible de los analitos seleccionados que el contenido total de estos contaminantes en una matriz como el suelo con diferentes dosis de biosólido, cuyas diferencias se muestran en la Tabla 20 solamente para el caso de 4-NF. Por estas razones la posibilidad de utilizar un método biomimético como el presentado aquí es una ventaja en comparación con el cultivo de plantas en invernadero, principalmente por el tiempo que esto involucra y ya que es más representativo que una extracción cuantitativa o exhaustiva del contenido de contaminantes directamente desde una matriz determinada.

**Tabla 20: Concentración total de 4-NF en el suelo y biodisponibilidad en trigo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración total de 4-NF en suelo-biosólido [mg/kg]</b>	<b>Biodisponibilidad de 4-NF en raíz de trigo [mg/kg]</b>	<b>Biodisponibilidad de 4-NF en parte aérea de trigo [mg/kg]</b>
<b>B100</b>	16,9	3,8	3,00
<b>B200</b>	28,2	5,7	4,5
<b>BE100</b>	74	14	7
<b>BE200</b>	167	33	9

Más determinaciones de biodisponibilidad con otras dosis de biosólido en trigo, el estudio de biodisponibilidad en los granos de trigo así como el estudio de otras variables además de la temperatura en la extracción biomimética, un mayor número de ensayos, etc. son consideraciones que contribuirían a darle mayor representatividad al método biomimético propuesto, sin embargo este representa la factibilidad real de disponer de un método que permita estimar la biodisponibilidad fácilmente.

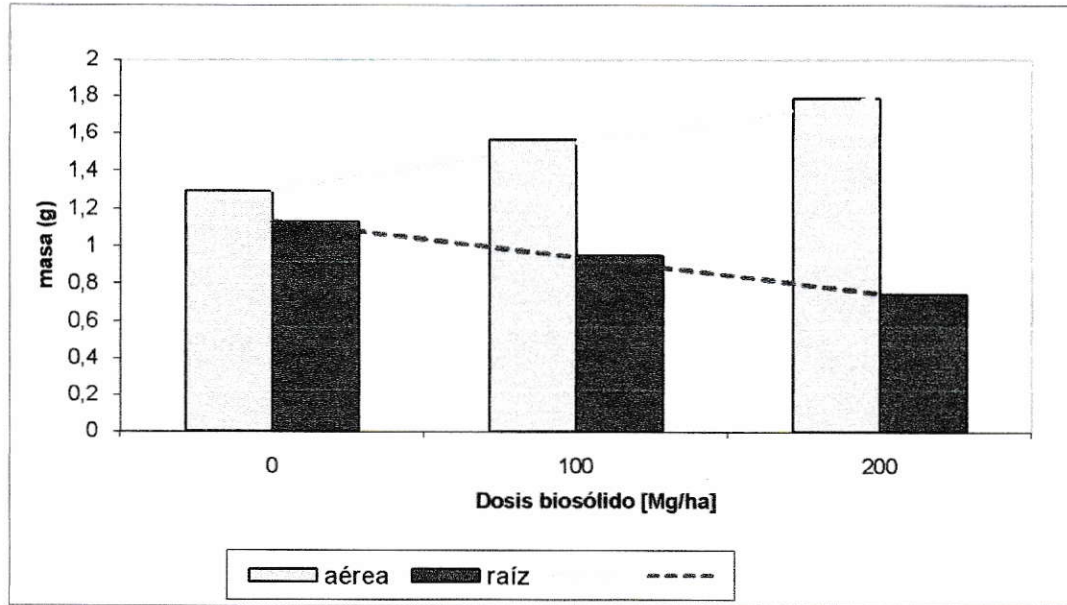


**Figura 9:** Esquema comparativo entre un método biomimético y un método tradicional de extracción en plantas de invernadero, para determinar biodisponibilidad, considerando los tiempos asociados a cada etapa.



### **3.6. Efecto de la aplicación de biosólido en el crecimiento de trigo.**

En la Figura 10 se observa el efecto que tiene la aplicación de biosólido en el crecimiento de trigo y en definitiva la incorporación de materia orgánica, micro y macro nutrientes, en el crecimiento de las diferentes partes de la planta en el caso del trigo y probablemente extrapolable otras especies. Claramente se observa una tendencia decreciente en el tamaño o cantidad de raíces a medida que la disponibilidad de materia orgánica en el sustrato aumenta, paralelamente con la dosis de biosólido aplicado. Esto puede interpretarse como que la planta al "encontrar" una mayor disponibilidad de nutrientes en el sustrato, no requiere invertir más energía en el crecimiento de sus raíces y por lo tanto en el tamaño de éstas, incorporando lo necesario a través de raíces más pequeñas, menos raíces o raíces de mejor calidad (INIA. 2008), lo cual como se muestra en la Figura 10 se refleja en la masa total de esta fracción de la planta. Por otra parte la planta podría destinar esta energía que no utiliza en el crecimiento radicular en un mayor desarrollo de su parte aérea, traduciéndose esto en una mayor masa de esta fracción o en el caso de especies frutales, también frutos de mejor calidad.



**Figura 10:** Efecto de dosis de biosólido en el crecimiento de parte aérea y raíces en plantas de trigo.

#### IV. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y a los objetivos propuestos se puede concluir lo siguiente:

Se determinó el contenido total de los etoxilatos de alquilfenol y alquilfenoles seleccionados (4-t-OF, 4-NF, 4-n-OF, 4-OFE y 4-NFE) en el biosólido, utilizando una metodología de extracción exhaustiva con solventes presurizados y un método cromatográfico previamente optimizados para este tipo de matriz y para los analitos estudiados.

Los analitos 4-NFE y 4-NF, identificados uno como precursor y el otro como disruptor endocrino, respectivamente, son los más abundantes en el biosólido entre los compuestos determinados, con concentraciones de 963 mg/kg y 327 mg/kg, respectivamente. El resto de los analitos muestran concentraciones en un orden de magnitud inferior. En el caso de 4-t-OF 2,29 mg/kg, el 4-n-OF 32,8 mg/kg, y 4-OFE 0,80 mg/kg.

La biodisponibilidad de los analitos seleccionados fue determinada mediante la extracción exhaustiva en muestras de trigo cultivado en suelo, con diferentes dosis de biosólido (B) y biosólido enriquecido (BE) con NF. 4-NF y 4-NFE son los analitos encontrados en mayor concentración en el trigo. En particular la concentración de 4-NF en trigo es entre 3 mg/kg y 33 mg/kg y la de 4-NFE entre 1,6 mg/kg y 9,5 mg/kg. Con respecto al resto de los analitos seleccionados, todos ellos muestran concentraciones inferiores a 1 mg/kg en la mayoría de los casos, solamente 4-n-OF tiene una

concentración mayor, de 3,0 mg/kg en parte aérea de la planta. Entonces es posible afirmar que los cinco analitos son biodisponibles para el trigo, cultivado en suelo tratado con biosólido y que esta biodisponibilidad, es significativa en el caso de 4-NFE y su etoxilato.

La cantidad de alquilfenol en el suelo tratado con biosólido se relaciona directamente con la biodisponibilidad de 4-NF y 4-NFE en trigo cultivado en este suelo. Esta relación no se observa en el caso de 4-t-OF, 4-n-OF y 4-OFE durante el tratamiento con biosólido no enriquecido.

Se propuso una metodología de extracción biomimética de 4-NF y 4-NFE mediante la extracción acelerada con agua presurizada como solvente de extracción, de manera simple. A través de la metodología de extracción biomimética de 4-NF y 4-NFE con agua presurizada como solvente de extracción se encuentra que la concentración de 4-NF y 4-NFE en los extractos muestra una correlación significativa con la concentración de estos analitos en la planta de trigo, tanto en la raíz como en la parte aérea. Los mejores coeficientes de correlación se obtuvieron para 4-NF en la raíz ( $R^2=0,9902$ ) y 4-NFE en la parte aérea ( $R^2=0,9935$ ).

La validación del método biomimético muestra que en el caso de 4-NF la biodisponibilidad estimada en promedio corresponde a un 106 % de la biodisponibilidad real encontrada en la parte aérea de trigo y a un 99,7% de la encontrada en la raíz; en el caso de 4-NFE corresponde en promedio a un 101% de la biodisponibilidad real encontrada en la parte aérea de trigo y a un 106% de la encontrada en la raíz.



## V. REFERENCIAS

Baez, M. y Zincker, J. 1999. Parámetros de calidad analítica de un método de determinación multiresiduos de plaguicidas por HPLC-DAD. Bol. Soc. Chil. Quím. v.44 n.3 Concepción set.

Becerra, J. P. 2003. Experiencia mundial sobre la gestión en agricultura de lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas servidas y evaluación de fitotoxicidad de lodos generados en la región metropolitana (Chile), mediante pruebas de germinación. Seminario de Título.

Boletín Oficial del Estado (BOE). 2009. [en línea] <http://www.boe.es/boe/dias /2004 /06/24/pdfs/A22859-22860.pdf>.

Brack W., Bandow, N., Schwab, K, Schulze T., Streck G. 2009. Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. Trends in Analytical Chemistry.

D.S. N° 123. 2006. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas. Ministerio Secretaria General de la Presidencia de la Republica, Santiago Chile.

D.S. N° 148. 2003. Reglamento sanitario sobre manejo de lodos peligrosos. Ministerio de Salud, Santiago Chile.

Devin-Clarke D. y Brown, S. 2008. Effect of plants on degradation of 4-Nonylphenol in biosolids amended soils.

Epstein E. 2003. Land Application of Sewage Sludge and Biosolids. Lewis Publishers. CRC Press. Boca Raton, USA.

European Communities (EC). 2001. Disposal AND Recycling Routes for Sewage Sludge. Part 1-2-3-4. [en línea] <<http://europa.eu.int>>

European Union (EU, 2001), Decisión N° 2455/2001/Ec, Off. J. L331, 15/12/2001.

Gadzala-Kopciuch, R., Filipiak, A., Buszewski, B. 2007. Isolation, purification and determination of 4-n-Nonylphenol and 4-tert-Octylphenol in aqueous and biological samples. Talanta, doi:10.1016/j.talanta.2007.06.028.

INIA. 2008. [en línea] <[http://www.inia.cl/inialdia/transferecia/ Tratamiento de Lodos de Platina.html](http://www.inia.cl/inialdia/transferecia/Tratamiento%20de%20Lodos%20de%20Platina.html)>

Instituto Nacional de Estadísticas (INE). 2009. [en línea], [http://www.ine.cl/cd2002/sintesis\\_censal.pdf](http://www.ine.cl/cd2002/sintesis_censal.pdf)

Instituto Nacional de Normalización (INN). 2004b. Norma Chilena NCh 2952.c2004. Lodos-Requisitos y condiciones para un plan de aplicación en suelos. Santiago, Chile.

Kinney, C.A., F.E., Zaugg, S.D., Burkhardt, M.R., Werner, S.L., Cahill, J.D. y Jorgensen, G.R. 2006. Survey of Organic Wastewater Contaminants in Biosolids Destined for Land Application. Environmental Science & Technology.

La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., and Mainor, T.M. 2001. Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids).

Langford, K.H., Scrimshaw, MD., Birkett, j.w., Lester, j.n. 2005. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. Chemosphere 61, 1221-1230.

Marican, A. 2008. Desarrollo y optimización de una metodología de extracción con solvente presurizado de derivados de alquilfenoles en biosólidos y suelos. Aplicación en estudios de degradación y movilidad (avance de tesis).

Meesters, R.J.W., Schröder, H.Fr. 2002. Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge. Anal. Chem. 74, 3566-3574.

Met calf & Eddy. 2003. Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización. 3ª edición. Mcgraw-Hill. Pp 436-437, 480-483, 865-867, 871-873.

Núñez, L., Turiel, E., Tadeo, J.L..2007. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxilates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A. 1146,157-163.



Peng, X., Wang, Z., Mai, B., Chen, F., Chen, S., Tan, J., Yu, Y., Tang, C., Li, K., Zhang, G., Yang, C. 2007. Temporal trends of nonylphenol and bisphenol A contamination in the Peral River Estuary and the adjacent South China Sea recorded by dated sedimentary. 2007. *Sci. Total Environ.*, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.05.043

Pignatello, J.J. y Xing, B. 1996. Mechanism of show sorption of organic chemical to natural particles.

Sadzawka R., A., M.A. Carrasco R., R. Grez Z., M.L. Mora G., H. Flores P. y A. Neaman. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Revisión 2006. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA N° 34, Santiago, Chile, 164p.

Semple K., Doick K., Jones, K. Burahuel P., Cravew, A. Harás, H. 2004. *Environmental Science & Technology*, June 15, 2004, 229-231.

Super Intendencia de Servicios Sanitarios (SISS). 2009. [en línea] <<http://www.siss.cl/article-3683.html>>, Chile.

Van der Wal, L., Jager T., Fleuren, R., Barendregt, A., Sinnige T., Vangestel C. y Hermens, J. 2004. Solid-phase microextraction to predict bioavailability and accumulation of organic micropollutants in terrestrial organisms after exposure to a field-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4842-4848.

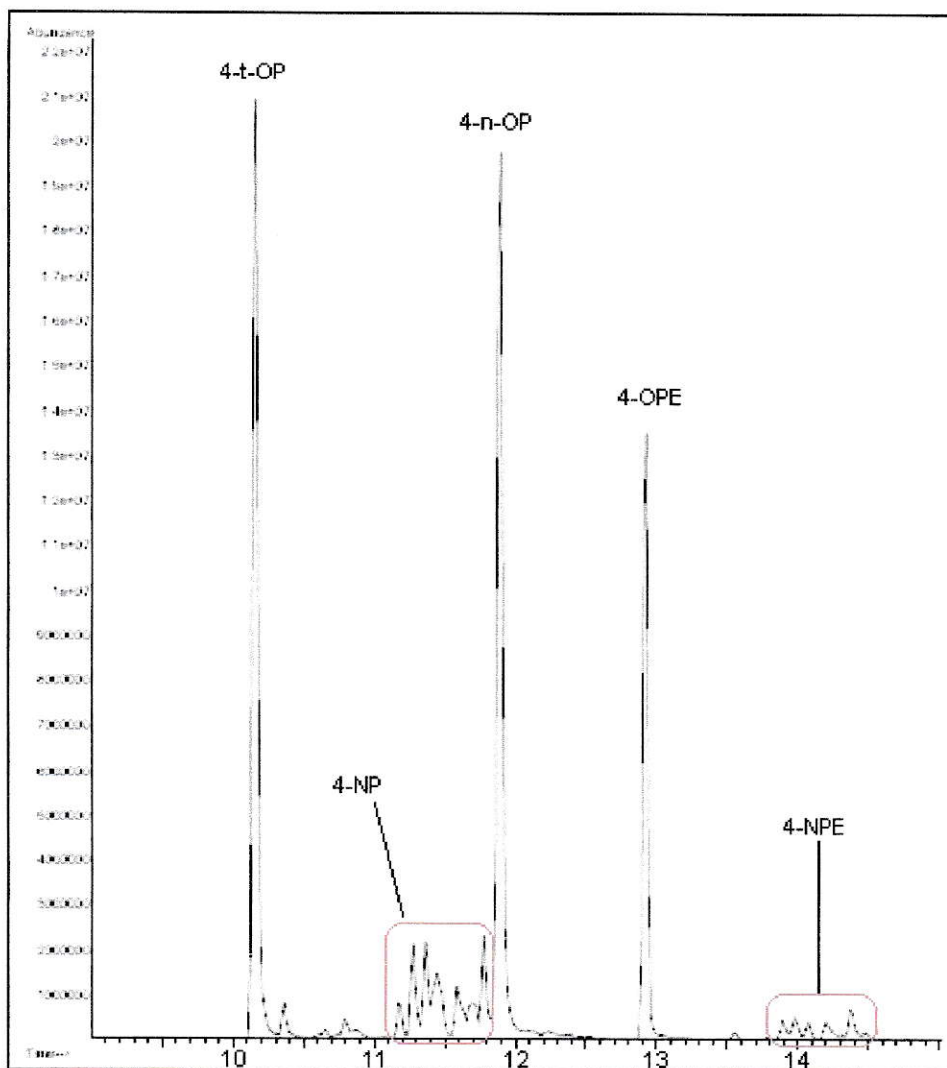
Xia, K., y Yoon Jeoung, C. 2004 Photodegradation of the Endocrine-Disrupting Chemical 4-Nonylphenol in Biosolids Applied Soil. *J. Environ. Qual.* 33:1568-1574.

Yagüe, F.C.; Hernandez, M.T. y Montero, J. I..1987. Utilización Agrícola de Lodos de Depuradora. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España. 122p.

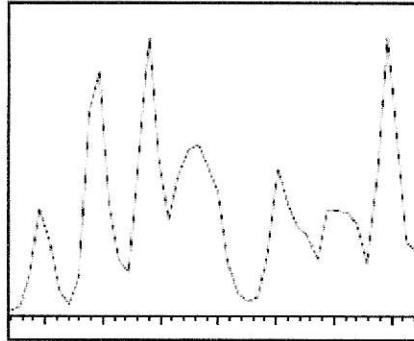
## VI. ANEXOS

## ANEXO 1

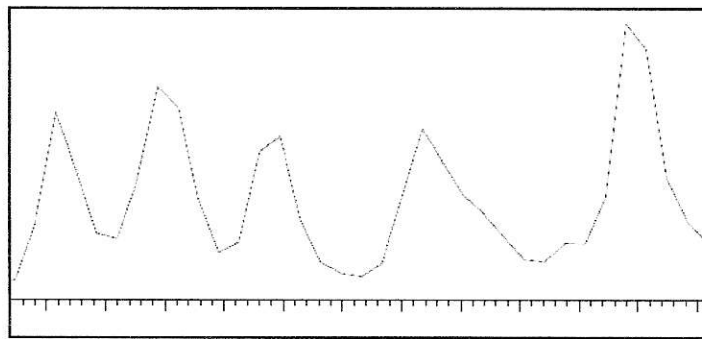
### 6.1 Espectros de masa de analitos seleccionados.



**Figura 11:** Cromatograma de analitos seleccionados. Se muestran las señales simples en el caso de 4-t-OF (10,329 mín.), 4-n-OF (12,182 mín.) y 4-OFE (13,301 mín.). Por otra parte 4-NF (11,431-12,065 mín.), al igual que 4-NFE (14,336-14,836 mín.) aparecen en cuadros rojos y corresponden a conjuntos de señales (peineta).



**Figura 12:** Fragmento ampliado de cromatograma, correspondiente al conjunto de señales pertenecientes a 4-NF.



**Figura 13:** Fragmento ampliado de cromatograma, correspondiente al conjunto de señales pertenecientes a 4-NFE.

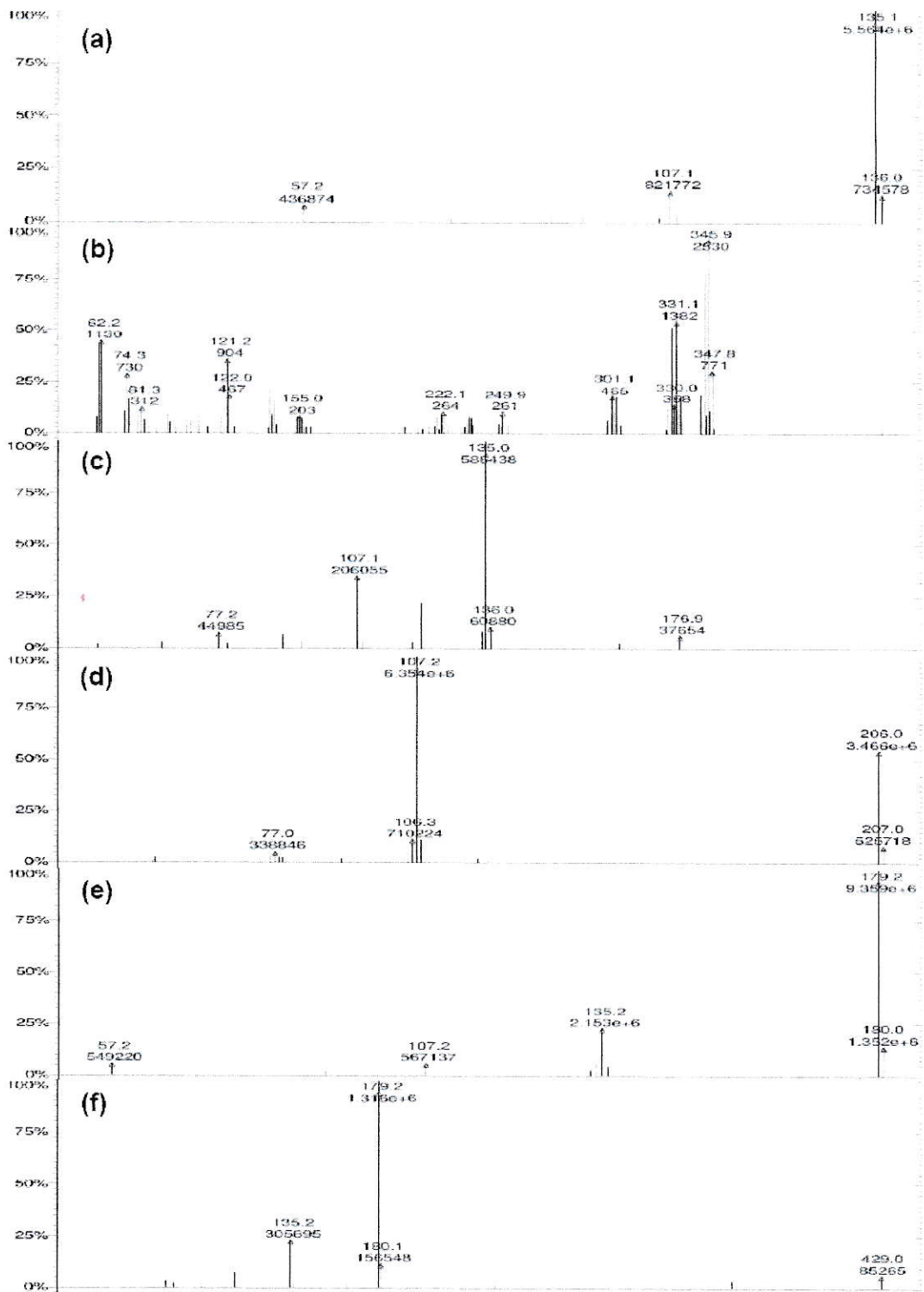


Figura 14: Espectros de masas: (a) 4-t-OP; (b) TBA; (c) 4-NF; (d) 4-n-OP; (e) 4-OPE; (f) 4-NFE.

## ANEXO 2

### 6.2 Calculo de preparación de dosis de biosólido:

$$1 \text{ ha} = 1000 \text{ m}^2$$

$$\text{profundidad de muestreo} = 0,2 \text{ m}$$

$$\text{volumen} = 2000 \text{ m}^3$$

Luego se determina experimentalmente la densidad del suelo y se calcula la masa correspondiente a ese volumen según:

$$\text{volumen}[\text{m}^3] \times \text{densidad} \left[ \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right] = \text{masa}[\text{kg}]$$

por ejemplo:

$$\text{densidad experimental} = 1111,1 \left[ \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right]$$

$$2000[\text{m}^3] \times 1111,1 \left[ \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right] = 2222200 [\text{kg}]$$

Entonces por ejemplo para preparar 1,5 kg de una dosis de 100 Mg/ha correspondería:

$$\frac{100 \text{ Mg lodo}}{1 \text{ ha}} \Rightarrow \frac{100 \text{ Mg lodo}}{222200 \text{ kg suelo}}$$
$$\frac{100 \text{ Mg lodo}}{2222200 \text{ kg suelo}} \times 1,5 \text{ kg suelo} = 67,50 \text{ g lodo}$$

Este ejemplo representa el calculo en el caso de utilizar suelo y biosólido seco, sin embargo en realidad tanto el suelo como el biosólido contienen humedad, por lo que previamente se mide el contenido de humedad de ambos y se calcula un factor (muestra húmeda /muestra seca). Las masas correspondientes se multiplican por este valor para corregir el cálculo. En el caso del ejemplo la cantidad real de lodo utilizado para esa dosis fue de 74,60 g de lodo.



## ANEXO 3

### 6.3 Ecuaciones para cálculo de LD y LC.

$$LD = 3 \times \left( \frac{DE}{m} \right) \times \sqrt{\left( \frac{n-2}{n-1} \right)}$$
$$LC = 10 \times \left( \frac{DE}{m} \right) \times \sqrt{\left( \frac{n-2}{n-1} \right)}$$

*DE : desviación estándar de la regresión*  
*m : pendiente*  
*n : numero total de pares de datos para la regresión*

En el cuadro superior se muestran las ecuaciones correspondientes al cálculo del LD y LC instrumentales que básicamente corresponden a la misma expresión salvo que LD lleva un factor 3 y LC un factor 10. (Baez, M. y Zincker, J. 1999)

Por ejemplo en el caso de 4-t-OH, para el cálculo de LD, tenemos:

$$LD = 3 \times \left( \frac{0,00834}{0,47109} \right) \times \sqrt{\left( \frac{9-2}{9-1} \right)}$$
$$LD = 0,04968 = 0,05 \left[ \frac{mg}{L} \right]$$
$$LD = 50 \left[ \frac{\mu g}{L} \right]$$