

UCH-FC
Q. Ambiental
R671
C.2



**DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS
(PCBs) EN BIOSÓLIDOS UTILIZANDO DISOLVENTES
PRESURIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN Y GC - MS
PARA SU CUANTIFICACIÓN.**

Seminario de Título

entregado a la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

QUIMICO AMBIENTAL

GABRIELA FRANCISCA ROCCO ROSALES

Director de Seminario de Título: Dr. Pablo Richter Duk

Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja Castillo

Septiembre, 2007.



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 la alumna

Gabriela Francisca Rocco Rosales

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del seminario de Título como requisito para optar al título de Químico Ambiental.

Director Seminario de Título:

Dr. Pablo Richter D.



.....

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Prof. Patrocinante:

M. Cs. Sylvia Copaja C.



.....

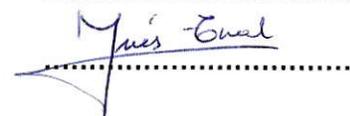
Correctores:

M. Cs. Inés Ahumada



.....

Prof. María Inés Toral



.....



CURRICULUM VITAE

Antecedentes Personales

- **Nombre:** Gabriela Francisca Rocco Rosales.
- **Dirección:** María Inés N° 10262, Casa F, La Florida, Santiago.
- **Fecha de Nacimiento:** 6 de Marzo de 1980.
- **Teléfono:** (02)2912425 - (08)8602510.
- **E- Mail:** gabi.rocco@gmail.com



Antecedentes Académicos

- **Enseñanza Básica:** Escuela Básica D N° 212, Peñalolén (1° a 4° Básico).
Colegio Antonio Hermida Fabres N° 171, Peñalolén (5° a 8° Básico).
- **Enseñanza Media:** Liceo N°7 de Niñas, Luisa Saavedra, Providencia (1° a 4° Medio).
- **Estudios Universitarios**
Nombre Carrera o Programa: Química Ambiental.
Institución Educacional: Universidad de Chile.
Dirección: Las Palmeras 3425, Ñuñoa. Casilla 653, Santiago.

Experiencia Académica

Realización de Unidad de Investigación

- Tema: Monooxigenasas de Giberelinas en el Hongo *Giberella Fujikuroi*, Desarrollada en el Laboratorio de Bioquímica de la Dra. María Cecilia Rojas Garrido, ubicado en la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Participación en eventos científicos

- Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y de bifenilos policlorados (PCBs) en biosólidos utilizando disolventes presurizados para la extracción y GC - MS para su cuantificación, Mauricio Retamal, Gabriela Rocco, Carla Toledo, Adolfo Maricán, Inés Ahumada y Pablo Richter, 2º Congreso Iberoamericano y 4º Argentino de Química Analítica, Asociación Argentina de Químicos Analíticos, Buenos Aires (2007), Argentina.

Otros

- Curso: Recientes Avances en el Análisis de Disruptores Endocrinos (EDCs) y Compuestos de uso Farmacéutico en el medio Ambiente mediante Espectrometría de Masas, dictado por el Profesor Dr. Damià Barceló, realizado en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
- Actualmente se trabaja en la publicación de este trabajo en una revista científica.



Creo que todos buscamos lo mismo
no sabemos muy bien que es ni donde esta
oímos hablar de la hermana mas hermosa
que se busca y no se puede encontrar...

... La Libertad (Andrés Calamaro)

Dedicada a todos aquellos que van de frente
por la vida en búsqueda constante
de su libertad.



AGRADECIMIENTOS

Cualquier meta propuesta se puede alcanzar con la cuota necesaria de perseverancia, sin embargo, cuando se está rodeada de un grupo rico en calidad humana, la carga se hace mucho más liviana. Agradezco a mis compañeras de carrera Alejandra Palma y Priscilla Sagredo por su amistad a lo largo de “este camino que caminamos juntas”, a Diego Briones por haber estado en el momento exacto, a Carla Toledo por su constante disposición y apoyo durante el desarrollo de esta memoria de título.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su buena acogida, en especial a Cristina Pedraza, Mauricio Retamal, Mario Riquelme, Ady Giordano y Loreto Ascar por interesarse cuando surgieron dificultades y ayudarme a resolverlas.

Agradezco a las profesoras Sylvia Copaja, María Inés Toral e Inés Ahumada por su valioso aporte en conocimientos. Además, a la señora Inés le agradezco por hacerme sentir parte de su laboratorio. Agradezco al profesor Pablo Richter por su importante guía como director de tesis y por la libertad que me otorgó durante la realización de este trabajo. Agradezco al centro de estudio para el desarrollo de la química CEPEDQ por concederme la instrumentación necesaria para los análisis GC – MS y por la ayuda recibida de parte de Betsabeth, Cecilia y Carola.

Agradezco a los proyectos FONDECYT 103005 y 1050288 por el financiamiento que hizo posible esta investigación.

Finalmente, quiero expresar los máximos agradecimientos a mi familia por ser el sostén emocional de mi vida, a ti mi viejita adorada y a ustedes Gloria, Pablo, Carolina y Diego mis queridos hermanos, quienes han sido la motivación fundamental para la realización de este trabajo.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. Introducción	1
1.1 Historia y distribución de PCBs	5
1.2 Características generales de los PCBs	6
1.2.1 Propiedades físicas y químicas de los PCBs	6
1.2.2 Formación del anillo de bifenilo	7
1.2.3 Toxicología de los PCBs	8
1.2.4 Factores de equivalencia tóxica (TEF)	9
1.2.5 Efecto de los PCBs sobre la salud humana	10
1.2.6 PCBs en el Medio Ambiente	12
1.2.7 Situación de los PCBs en Chile	14
1.2.8 Normativa para PCBs	15
1.2.9 Actuales tecnologías de destrucción de PCBs	16
1.3 Tendencias nacionales sobre la disposición de biosólidos	18
1.4 Técnicas utilizadas para la extracción de PCBs desde matrices sólidas	18
1.4.1 Extracción con disolvente presurizado (PSE)	21
1.4.2 Extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido (PSE – US)	23
1.4.3 Variables que afectan el proceso de extracción	23
1.5 Determinación mediante GC- MS	24
1.5.1 Acoplamiento cromatografía de gases - espectrometría de masas	27
1.6 Diseño estadístico de experimentos	28



II. Hipótesis	30
III. Objetivos	31
3.1 Objetivo General	31
3.2 Objetivos Específicos	31
IV. Materiales y métodos	32
4.1.1 Reactivos	32
4.1.2 Materiales	32
4.1.3 Equipos	34
4.2 Preparación de la muestra	35
4.3 Procedimiento para la extracción con disolvente presurizado (PSE)	35
4.4 Procedimiento para la extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido (PSE - US)	37
4.5 Procedimiento para secar el extracto	37
4.6 Procedimiento para la concentración del extracto	38
4.7 Procedimiento de limpieza del extracto	39
4.8 Procedimiento de extracción Soxhlet	41
4.9 Procedimiento para el análisis de PCBs	42
4.9.1 Preparación de estándares	42
4.9.2 Estándar interno	42
4.9.3 Procedimiento GC – MS	42
4.10 Procedimiento para el diseño experimental	44



V. Resultados y Discusión	46
5.1 Determinación de las variables estadísticamente significativas	49
5.2 Optimización	54
5.3 Validación del método PSE en términos de precisión y exactitud	56
5.4 Efecto del tiempo de ultrasonido en la extracción PSE - US	58
5.5 Validación del método PSE – US mediante parámetros analíticos	59
5.5.1 Obtención de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)	59
5.5.2 Estudio de repetibilidad para el método de extracción PSE –US	63
5.6 Comparación de la eficiencia de extracción de las metodologías desarrolladas PSE y PSE – US con la metodología de extracción tradicional Soxhlet	64
5.7 Aplicación del método PSE – US a muestras reales	69
VI. Conclusiones	76
VII. Referencias	78



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Nombres generales de los PCBs	4
Tabla 2 TEF según la OMS para algunos PCBs coplanares	10
Tabla 3 Iones de cuantificación y confirmación de los distintos homólogos de PCBs	43
Tabla 4 Diseño experimental del tipo screening 2^3 exp + 3 center point	44
Tabla 5 Matriz de experimentos para un diseño factorial del tipo screening 2^3 experimentos + 3 puntos centrales	45
Tabla 6 Tiempos de retención para los picos de los distintos homólogos de PCBs	49
Tabla 7 Matriz de Respuesta (área analito/área estándar interno) para el diseño experimental fraccionado de dos niveles para las tres variables	50
Tabla 8 Efectos estimados para la respuesta	51
Tabla 9 Análisis de varianza para la respuesta	52
Tabla 10 Estudio del efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción	53
Tabla 11 Respuesta expresada mediante la relación de áreas (A suma PCBs/ A EI) a distintos tiempos dinámicos de extracción.	54
Tabla 12 Precisión y exactitud del método PSE	57
Tabla 13 Efecto del tiempo de ultrasonido (US) en la extracción de PCBs	58
Tabla 14 Porcentaje de homólogos de PCBs presente en las mezclas de Aroclor	60
Tabla 15 Concentración de homólogos de PCBs para la construcción de las curvas de calibración	60
Tabla 16 Límites de detección y de cuantificación para los distintos homólogos de PCBs	63
Tabla 17 Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad del método PSE – US	64
Tabla 18 Comparación de la eficiencia de extracción de las distintas metodologías de extracción	67
Tabla 19 Contenido de homólogos de PCBs en las muestras de biosólido	74



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Posible distribución de los átomos de cloro en los anillos de bifenilo	3
Figura 2 Reacción de formación del anillo de bifenilo	7
Figura 3 Estructura de PCBs coplanares y 2, 3, 7, 8 – TCDD (dioxina más tóxica)	10
Figura 4 Formación de PCDFs durante la combustión de los PCBs	16
Figura 5 Sistema de extracción con disolvente presurizado (PSE)	36
Figura 6 Baño de ultrasonido usado en la extracción de PCBs	37
Figura 7 Sistema para secar los extractos	38
Figura 8 Sistema concentrador Kuderna Danish	39
Figura 9 Limpieza de los extractos mediante sílica gel	40
Figura 10 Sistema de extracción Soxhlet	41
Figura 11 Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masa	44
Figura 12 Cromatograma de estándar PCBs, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Aroclor 1254 y Aroclor 1260)	46
Figura 13 Cromatogramas de todos los iones de PCBs	47
Figura 14 Cromatograma con picos representativos del hexaclorobifenilo ($m/z = 360$)	48
Figura 15 Gráfico de Pareto estandarizado para los efectos entre las variables	51
Figura 16 Efecto del tiempo dinámico de extracción sobre la respuesta	55
Figura 17 Curva de calibración de PCBs (rango 1 – 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	56
Figura 18 Curva de calibración para bifenilos tetraclorados	61
Figura 19 Curva de calibración para bifenilos pentaclorados	61
Figura 20 Curva de calibración para bifenilos hexaclorados	62
Figura 21 Curva de calibración para bifenilos heptaclorados	62



Figura 22 Cromatograma de un extracto obtenido mediante metodología PSE en condiciones optimizadas	65
Figura 23 Cromatograma de un extracto obtenido mediante metodología PSE – US en condiciones optimizadas	66
Figura 24 Cromatograma de un extracto obtenido mediante metodología convencional Soxhlet	66
Figura 25 Cromatograma de un extracto de biosólido año 2004	69
Figura 26 Picos para los iones m/z 362 y 360 del estándar a una concentración de 0,1 mg μL^{-1}	70
Figura 27 Picos para los iones m/z 362 y 360 de la muestra de biosólido año 2004	71
Figura 28 Áreas de los picos cromatográficos integradas para los iones m/z 362 y 360 del estándar a 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	72
Figura 29 Áreas de los picos cromatográficos integradas para los iones m/z 362 y 360 de la muestra de biosólido año 2004	72



LISTA DE ABREVIATURAS

ASE	Extracción acelerada con disolvente
COPs	Contaminantes orgánicos persistentes
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LOD	Límite de detección
MAE	Extracción asistida por microondas
LOQ	Límite de cuantificación
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCBs	Bifenilos policlorados
PCDDs	Policlorodibenzodioxinas
PCDFs	Policlorodibenfuranos
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PSE	Extracción con disolvente presurizado
PSE – US	Extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido
SCAN	Monitoreo múltiple de iones
SFE	Extracción con fluido supercrítico
SIR	Registro selectivo de iones
SWE	Extracción con agua subcrítica
TCDD	Tetraclorodibenzo-p-dioxina
TEFs	Factores de equivalencia tóxica

TIC	Corrida total de iones
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles

RESUMEN

La elevada toxicidad de contaminantes orgánicos tales como bifenilos policlorados (PCBs) presentes en el medio ambiente obliga a disponer de métodos analíticos rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan su determinación en diferentes muestras ambientales. La técnica de extracción comúnmente aplicada para la determinación de PCBs desde una matriz sólida corresponde a la extracción Soxhlet, sin embargo, esta técnica requiere de grandes cantidades de disolvente y tiempo de 16 a 24 horas. Recientemente técnicas de extracción se han desarrollado para reducir los consumos de disolvente y tiempo, como la extracción con disolventes presurizados (PSE).

Para la extracción de PCBs desde biosólidos se desarrolló y optimizó un método basado en el uso de disolventes presurizados en continuo asistido por ultrasonido, seguido por análisis GC-MS, utilizando un método selectivo de monitoreo de iones para los distintos homólogos de PCBs. El sistema de extracción desarrollado consta básicamente de una bomba HPLC, baño de ultrasonido, celda de extracción, enfriador y válvula que regula la presión. Se estudiaron las variables de extracción: temperatura, tiempo dinámico y tiempo estático. Para la optimización fue utilizado un diseño factorial fraccionado de screening a dos niveles que incluyó estas variables.

Los extractos fueron sometidos a procedimientos de limpieza recomendados por la USEPA. Como muestra de referencia se utilizó un biosólido enriquecido con 50 mg kg^{-1}

de PCBs. Se pesaron 500 mg de muestra y para la extracción se utilizó una mezcla de acetona/diclorometano 1:1 v/v. Se estableció a través del análisis estadístico que el tiempo dinámico es la única variable significativa ($P < 0.05$). Posteriormente se optimizó esta variable obteniéndose una eficiencia óptima de extracción de 30 minutos. Para aumentar la eficiencia del método se consideró la aplicación de ultrasonido y se estableció que el hecho de llevar a cabo este procedimiento permitió aumentar el porcentaje de recuperación de un 72% a un 103%. En las condiciones óptimas se aplicó el método a muestras de biosólidos, encontrándose concentraciones de PCBs en un rango de $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ a $0,32 \text{ mg kg}^{-1}$.

ABSTRACT

The high toxicity detected in the environment due to organic contaminant, such as Polychlorinated biphenyls (PCBs) has forced the set up of fast, cheap and highly sensitive analytical methods that allow its detection on different environmental matrix. The extraction technique commonly used during the PCBs determination from a solid grid is the Soxhlet extraction; however, this technique involves large quantities of solvent and 16-to 24 hours. New extractions techniques have been recently develop in order to decrease the solvent use and the time involved. An example of the latter is the pressurized solvent extraction (PSE).

A method based on the continuous pressurized solvent use assisted through ultrasound was developed and optimized for the PCBs extraction from biosolids. This extraction system includes a HPLC bomb, an ultrasound bath, an extraction cell, a cooler and a pressure-regulating valve. The determination was by GC-MS analysis using a selective ion monitoring method for the different PCBs types. Extraction variables such as temperature, dynamic time and static time were studied. A two-level screening dividing factor design was used for the optimization; this design included all the variables

The extracts were subjected to the cleaning procedures recommended by the USEPA. A PCBs 50 mg kg⁻¹ enriched biosolid was used as a reference sample. A total of 500 mg of sample was weighed and a 1:1 v/v acetone/dichloromethane mixture was used for the extraction.

Through this statistical analysis it was established the dynamic time is the only significant variable ($P < 0.05$). Subsequently, this variable was optimized and an optimum extraction efficiency of 30 minutes was obtained. The use of an ultrasound was considered to increase the method efficiency and this procedure established a recovery percentage increase (from 72% to 103%). At optimum conditions the use of this method to biosolid samples was used and PCBs concentrations in a range from 0.20 mg kg^{-1} to 0.32 mg kg^{-1} .

I. INTRODUCCIÓN

En Chile, el aumento en la operación de plantas de tratamiento de aguas servidas genera grandes cantidades de un producto residual, conocido genéricamente con el nombre de lodos o biosólidos. Actualmente, los biosólidos son dispuestos principalmente en monorellenos situación que genera grandes problemas en el medio ambiente por contaminación química, patógenos y atracción de vectores. Tales razones hacen necesario buscar mejores formas de disposición, entre ellas, su posible utilización en suelos agrícolas (Clapp y col, 1994).

La aplicación de biosólidos supone un aporte de macronutrientes como Nitrógeno, Carbono, Potasio y Azufre, y de micronutrientes como Cobre, Zinc, Hierro y Manganeso, elementos indispensables para las plantas (Smernik y col 2004, Berti y Jacobs, 1998). Además por su alto contenido de materia orgánica (aproximadamente 40% en peso seco) la utilización de biosólidos en la agricultura ayuda a mejorar la estructura y porosidad del suelo, incrementa su capacidad de retención de agua, mejora el suelo cultivable y activa la vida microbiológica (Artiola 1996, Bitton 1999, Clapp y col, 1994).

Sin embargo, el uso de biosólidos en suelos agrícolas debe ser regulado, habiéndose detectado inconvenientes tanto desde el punto de vista sanitario como ambiental, ya sea por la presencia de organismos patógenos, metales pesados y compuestos tóxicos (Switzenbaum y col, McBride y col, 1997). Los principales problemas son, la posible

adsorción y acumulación de compuestos tóxicos en el suelo, absorción por los cultivos y posterior paso a la cadena trófica, constituyendo una amenaza para el hombre (Bitton G., 1999, Epstein E., 2003).

Como se mencionó, los biosólidos en su composición, presentan mayormente materia orgánica, y una fracción de ésta corresponde a compuestos orgánicos tóxicos, entre los que destacan plaguicidas, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos (PCDD/F), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos orgánicos volátiles (VOCs), compuestos alifáticos halogenados, fenoles y detergentes (USEPA, 1999).

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

Un tipo de compuestos orgánicos presentes en los biosólidos, son los bifenilos policlorados (PCBs), compuestos que han sido reconocidos desde finales de 1960 como una amenaza para el medio ambiente y para la salud de los seres vivos. Los PCBs forman parte de un grupo de doce sustancias sintéticas peligrosas COPs (contaminantes orgánicos persistentes), según el "Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, de 2001". De los doce COPs, ocho de ellos son utilizados como plaguicidas: aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin, heptacloro, mirex y toxafeno. Dos

son productos químicos de aplicación industrial: bifenilos policlorados y hexaclorobenceno (que también es usado como plaguicida) y dos son subproductos no deseados: dioxinas y furanos.

Los PCBs son una familia de compuestos producidos comercialmente por la cloración progresiva del bifenilo (Abramowicz D.A., 1990; OMS, 1993). La fórmula de los PCBs se representa como $C_{12} H_{10-n} Cl_n$, donde n es el número de átomos de cloro en la molécula (entre 1 y 10) (OMS, 1993). La cloración del bifenilo puede reemplazar de 1 a 10 átomos de hidrógeno por cloro (Figura 1), lo que permite teóricamente la formación de 209 posibles compuestos de PCBs, variando en el número y en la posición de los cloros (Abramowicz D. A., 1990; Hutzinger O. y col, 1974; OMS, 1993).

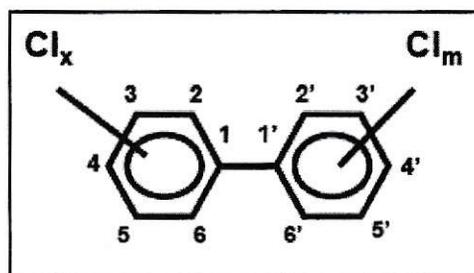


Figura 1: Posible distribución de los átomos de cloro en los anillos de bifenilo.

Los nombres de los PCBs están clasificados según la IUPAC, en tres tipos: homólogos, congéneres y mezclas. Los homólogos se refieren al nombre general de un PCB dependiendo del número de cloros que posea, los nombres de los congéneres indican la posición de cada cloro dentro de la molécula, las mezclas se usan debido a que

comercialmente no se han aislado los compuestos individuales de PCBs, en lugar de ello se han vendido como mezclas parcialmente separadas (Baird C., 2001). La Tabla 1 muestra los nombres homólogos, algunos congéneres y mezclas para explicar lo anterior.

Tabla 1: Nombres generales de los PCBs.

Nombre	Tipo
Monoclorobifenilo	Homólogo
Diclorobifenilo	Homólogo
Triclorobifenilo	Homólogo
Tetraclorobifenilo	Homólogo
Pentaclorobifenilo	Homólogo
Hexaclorobifenilo	Homólogo
Heptaclorobifenilo	Homólogo
Octaclorobifenilo	Homólogo
Nonaclorobifenilo	Homólogo
Decaclorobifenilo	Homólogo
2 - Clorobifenilo	Congénere
2,2',3,3',4,4',5,6' - Octaclorobifenilo	Congénere
Aroclor 1254	Mezcla
Aroclor 1260	Mezcla

Los PCBs se han comercializado bajo nombres diferentes tales como: Aroclor, Clophen, Pheno chlor, Pyralene, Kanechlor o Fenclor. En la serie Aroclor se utiliza un código de cuatro dígitos: los dos primeros representan al bifenilo (ATSDR, 2000), mientras que los dos últimos indican el porcentaje en peso del contenido de cloro en la mezcla; por ejemplo, el aroclor 1260 es una mezcla de PCBs con un 60% de cloro. En 1980, Ballschmiter y Zell propusieron un sistema numérico de identificación para todos los congéneres de PCBs, el cual fue adoptado por la IUPAC. Doce de ellos resultan de particular interés por ser similares a las dioxinas en relación a su toxicidad. Estos PCBs

son los que no tienen cloro en las posiciones orto (PCBs coplanares), o los que sólo tienen un átomo de cloro en una de las cuatro posiciones orto (PCBs mono-ortoclorados) (Epstein, 2003).

1.1 Historia y distribución de PCBs

Los PCBs se describieron por primera vez en la literatura técnica en 1881, fueron producidos a escala industrial por más de 50 años y se exportaron como materias primas prácticamente en todo el mundo. Se estima que la cantidad de PCBs producida entre 1930 y 1980 fue de 1.200.000 toneladas, de las cuales 400.000 se depositaron en los océanos y 800.000 en los aparatos de servicio. Los países que fabricaban PCBs incluían Austria, China, Checoslovaquia, Francia, Alemania, Italia, Japón, la Federación Rusa, España, Reino Unido y Estados Unidos. Estos compuestos fueron patentados en 1929 por la compañía Swan Chemical, quien en 1931 vendió la patente a la Monsanto Chemical, desde entonces fueron producidos bajo diferentes marcas. Los PCBs se usaron comúnmente como fluidos dieléctricos en transformadores y capacitores, en transferencia de calor, en sistemas hidráulicos y como solventes de tinta.. Otros usos de los PCBs incluían la formulación de lubricantes y aceites de corte, como suplementos para pesticidas, como agentes despolvantes, como plastificantes en pinturas, resinas sintéticas, adhesivos y sellantes, como retardantes de llama, en la preparación de tintas para imprentas y en plásticos (ATSDR, 1996). Fueron fabricados y utilizados en cantidades masivas durante varias décadas, hasta que fueron retirados del mercado en 1979 por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA)

principalmente debido a su capacidad de acumularse en el medio ambiente y por su potencial transporte dentro de la cadena alimenticia.

1.2 Características generales de los PCBs

1.2.1 Propiedades físicas y químicas de los PCBs

De acuerdo con el grado de cloración, el número y posición de los átomos de cloro, los PCBs varían sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, según el grado de sustitución pueden encontrarse como líquidos oleosos fluidos o como resinas transparentes duras. Son sustancias extraordinariamente estables debido a su inercia química y termorresistencia (temperaturas inferiores a 850 °C), no presentan inflamabilidad, son resistentes a los ácidos, a las bases y a los oxidantes. Poseen solubilidad muy baja en agua ($57 \mu\text{g L}^{-1}$ a 24°C), baja presión de vapor ($7,71 \times 10^{-5}$ mm Hg a 25 °C) y un alto coeficiente de partición octanol-agua (106,5). El coeficiente de partición octanol – agua (K_{ow}) es un índice del carácter lipofílico de los compuestos. Para las moléculas de PCBs este coeficiente es de los más altos entre todos los contaminantes orgánicos. Esto explica que los PCBs, una vez que son emitidos al medio ambiente, se depositan y se adsorben con facilidad en las superficies de partículas de polvo del aire, partículas del suelo, sedimentos, biosólidos, aceites, así como en el tejido adiposo humano. Este coeficiente se incrementa con el grado de cloración de las moléculas de PCBs.

Debido a su no inflamabilidad, estabilidad química, alto punto de ebullición y sus propiedades aislantes, los PCBs han sido empleados en diversas aplicaciones industriales

y comerciales. Aparte de su probabilidad de ocasionar cáncer, uno de los aspectos más preocupantes de estas sustancias es que, sometidas a temperaturas elevadas, en casos tales como los incendios o recalentamientos de transformadores eléctricos, pueden convertirse en dioxinas y furanos.

1.2.2 Formación del anillo de bifenilo

Aunque el benceno es un compuesto muy estable, el calentamiento a temperaturas muy altas puede romper los enlaces carbono – hidrógeno. Este hecho es explotado comercialmente, cuando el benceno se calienta alrededor de los 750 °C, en presencia de plomo (que actúa como catalizador) se da paso a la formación de bifenilo, que es una molécula en la que dos anillos bencénicos están unidos por un enlace simple formado entre los dos carbonos que han perdido su átomo de hidrógeno. Esta reacción se puede observar en la Figura 2.

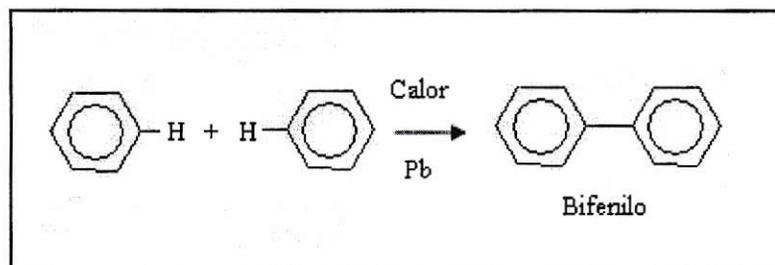


Figura 2: Reacción de formación del anillo de bifenilo.

Igual que el benceno, si el bifenilo reacciona con el Cl_2 en presencia de un catalizador de cloruro de hierro, algunos de sus átomos de hidrógeno quedan reemplazados por cloro. Cuanto más cloro esté inicialmente presente y cuanto mayor sea el tiempo de reacción,

mayor es la extensión de la cloración de la molécula de bifenilo. Los productos son bifenilos policlorados o abreviadamente, PCBs (Baird C., 2001).

1.2.3 Toxicología de los PCBs

Los resultados obtenidos en ensayos sobre animales indican que la toxicidad de las dioxinas, furanos y PCBs depende de la extensión y del tipo de sustitución por cloro. Si nos referimos como átomos “alfa” a los átomos de carbono centrales en el anillo de la dioxina, y “beta” a los más alejados, entonces se puede hacer la siguiente generalización: las dioxinas muy tóxicas son aquellas con tres o cuatro átomos de cloro en beta, y pocos en alfa. De este modo, la dioxina más tóxica es la 2, 3, 7, 8-TCDD, que tiene cuatro cloros en posición beta y ningún cloro en alfa (Baird C., 2001).

De acuerdo a ensayos realizados con animales, los PCBs más tóxicos son los que no tienen átomos de cloro (o a lo sumo uno) en las posiciones *orto* respecto a los carbonos que unen a los anillos, es decir, en los carbonos 2,2',6 y 6'. Sin cloros en *orto*, los anillos bencénicos pueden adoptar, fácilmente una configuración casi coplanar, de manera que la rotación alrededor del enlace C - C que une a los anillos es rápida. Sin embargo, si ambos cloros están en posición *orto* en el mismo lado de los dos anillos, tienden a alejarse mutuamente, debido a factores estéricos a causa del gran volumen que poseen; ello fuerza a los anillos a girar de manera de impedir que los anillos adopten una geometría coplanar. Así, las moléculas de PCBs con tres o cuatro átomos de cloro en posición *orto* no pueden adoptar una geometría coplanar. Si los anillos mantienen la coplanaridad por ausencia de interferencia entre los átomos de cloro, y si algunos de los

átomos de carbono en posiciones *meta* y *para* están sustituidos por cloros, la molécula de PCB puede alcanzar fácilmente la geometría coplanar, pasando a ser de tamaño y forma muy similar a la 2, 3, 7, 8 – TCDD, y por lo tanto, de alto carácter tóxico (Baird C., 2001).

El mecanismo primario de la acción tóxica de la 2, 3, 7, 8-TCDD y de los compuestos similares implica un enlace inicial entre la molécula contaminante y el receptor biológico específico; unión que está favorecida por la configuración plana del congénere (Goldstein J. A., Safe S., 1989).

1.2.4 Factores de equivalencia tóxica (TEF)

El número y la posición de los sustituyentes de cloro determinan el carácter tóxico de cada congénere de PCB. Respecto al número de átomos de cloro, los congéneres que tienen de uno a tres no tienen significado toxicológico frente a los que tienen un número mayor de átomos de cloro. Por otra parte, en cuanto a las posiciones sustituidas, los congéneres más tóxicos son los que tienen los átomos de cloro al menos en las posiciones 2, 3, 7 y 8, lo que los haría similar a la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2, 3, 7, 8-TCDD). De este modo, se ha acordado expresar la toxicidad como equivalentes tóxicos internacionales de la 2, 3, 7, 8-TCDD (I-TEQ) mediante el uso de los factores de equivalencia tóxica (TEFs). La concentración total de dioxinas y compuestos análogos se expresa como una cantidad de I-TEQ, que da una medida del potencial tóxico de la mezcla. Generalmente para las PCDDs y PCDFs se usan los Factores de Equivalencia Tóxica Internacional (I-TEFs) (NATO/CCMS 1988). En cuanto a los PCBs, una reunión

consultiva de la Organización Mundial sobre la Salud (OMS) en Bilthoven (Países Bajos), propuso a su vez una lista de factores de equivalencia tóxica (OMS-TEFs) que relacionan la toxicidad de estos PCBs con la de la 2, 3, 7, 8-TCDD (Ahlborg y col., 1992). Un factor de toxicidad de, por ejemplo; 0,5 indica que para un determinado compuesto el efecto tóxico producido por 10 ng es el mismo que el producido por 5 ng de 2, 3, 7, 8-TCDD.

Tabla 2: TEF según la OMS para algunos PCBs coplanares.

PCB	Fórmula
PCB-77	3,3',4,4'-Tetraclorobifenilo
PCB-126	3,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo
PCB-169	3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo
PCB-170	2,2',3,3',4,4',5-Heptaclorobifenilo

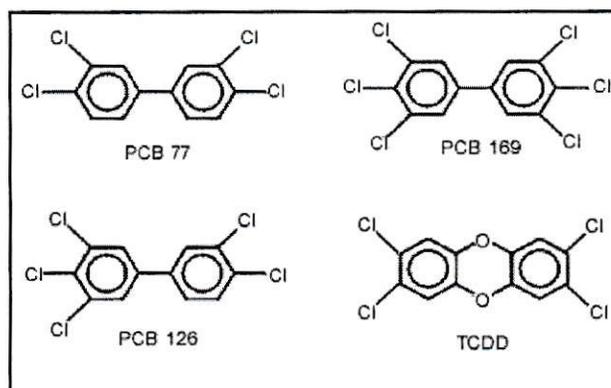


Figura 3: Estructura de PCBs coplanares y 2, 3, 7, 8 - TCDD (dioxina más tóxica).

1.2.5 Efecto de los PCBs sobre la salud humana

Los PCBs se almacenan en los tejidos grasos y no son fácilmente excretados ni metabolizados. Las principales vías de exposición de los seres humanos a los PCBs son los alimentos ingeridos (carnes rojas, cerdo, pescados, leche, lácteos, verduras, etc.),

accidentes industriales o tecnológicos (incendios, derrames, etc.), contacto por actividad laboral, contaminación del aire y el ambiente. Se han registrado dos importantes casos de intoxicación humana, uno en Japón (accidente de Yusho, 1968) y el otro en la provincia de Taiwán (accidente de Yu – Cheng, 1979) (Harukuni U., Masakazu A., 1985; OMS, 1993). Los principales síntomas de los pacientes de Yusho y Yu – Cheng se atribuyeron a los dibenzofuranos policlorados. Sin embargo, existen estudios donde se ha demostrado que algunos de los síntomas, principalmente los efectos respiratorios crónicos, pueden haber sido provocados por los metabolitos de metilsulfona de algunos compuestos de PCBs (Harukuni U., Masakazu A., 1985; OMS, 1993).

Los síntomas detectados producto de la ingestión de PCBs son hipersecreción ocular, pigmentación, erupciones acneiformes de la piel, perturbaciones del aparato respiratorio, efectos reproductivos, problemas endocrinos y efectos en el sistema inmune. Además de posibles alteraciones neurológicas en niños de madres expuestas a PCBs.

Los PCBs fueron evaluados por la IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) como posibles carcinógenos para humanos (Grupo 2A).

Se ha establecido que al igual que las dioxinas, los PCBs actúan como disruptores endocrinos, vale decir, alteran el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos: reemplazando a las hormonas naturales, bloqueando su acción, o en último caso, aumentando o disminuyendo sus niveles. Cuando imitan el comportamiento de algunas hormonas como los estrógenos, alteran el sistema endocrino, provocando defectos de nacimiento y esterilidad. Los efectos adversos de un perturbador

endocrino van a depender de las dosis, de la carga genética, de la forma y de la duración de la exposición a períodos críticos de vida. Esos efectos pueden ser reversibles o no, y manifestarse de forma aguda o latente. Las sustancias químicas disruptoras endocrinas no son venenos clásicos ni carcinógenos típicos. Los peligros en general están asociados a la exposición crónica, aún en concentraciones bajas. La EPA encontró que los efectos tóxicos de los PCBs se manifiestan incluso a concentraciones trazas, esto es, 9 ng kg^{-1} pueden dañar sistemas inmunológicos; 13 ng kg^{-1} disminuyen las hormonas sexuales en los hombres y 47 ng kg^{-1} provocan disminución en el crecimiento de los niños.

1.2.6 PCBs en el Medio Ambiente

Debido a su estabilidad y a su amplia utilización, junto con las prácticas en su disposición, los PCBs se han convertido en contaminantes muy extendidos y persistentes en el medio ambiente. Si se liberan al medio, los PCBs persisten a lo largo de años ya que son resistentes a la degradación por agentes químicos o biológicos (Baird, 2001). La vida media de los PCBs es de 4,2 días (aire) 5,7 años (agua) 1,14 años (suelo). En el agua, los PCBs se adsorben en los sedimentos y en la materia orgánica. Una fuerte adsorción, en el sedimento, especialmente de PCBs que presentan un elevado grado de cloración, disminuye la tasa de volatilización, por lo que pueden actuar como sumideros y depósitos de estos compuestos para los organismos. En las partículas del suelo, la baja solubilidad y fuerte absorción de los PCBs puede limitar la lixiviación, aunque los compuestos con menor grado de cloración tienen una mayor tendencia a la lixiviación que los más clorados. La transferencia de los PCBs del suelo a

la vegetación tiene lugar principalmente por la adsorción en la superficie externa de las plantas terrestres y los desplazamientos que se producen son escasos (ATSDR, 2000).

Si bien la solubilidad de PCBs en agua es muy baja, es posible que las pequeñas cantidades de PCBs se adsorban sobre partículas suspendidas en aguas superficiales, como consecuencia de la hidrofobicidad, esto es, se volatilizan a partir de las superficies hídricas, para depositarse en el suelo o en el agua, después de haberse desplazado por el aire durante algunos días. Por medio de este mecanismo, los PCBs han viajado por todo el mundo, de manera que hay niveles de fondo medibles, incluso en regiones polares y en el fondo de los océanos (Baird C., 2001), produciéndose contaminación tanto en el ambiente local como en el ambiente global. La contaminación con PCBs se produce principalmente por manejo inadecuado de productos que contienen o han sido fabricados con estos compuestos. Existe riesgo también por derrames, evento que posibilita el contacto de PCBs con cultivos y animales, así los PCBs debido a su persistencia y solubilidad en los tejidos grasos resisten la descomposición e incrementan su concentración a medida que ascienden en la cadena alimenticia. Los peces y crustáceos acumulan altas concentraciones. También se han encontrado en el hígado de especies de aves, en las cuales causan problemas reproductivos. En caso de incendio de equipos con PCBs, ocurren emanaciones tóxicas que contienen PCBs, dioxinas y furanos compuestos de elevada toxicidad que se dispersan al medio ambiente a través de las emisiones a la atmósfera, cenizas, escorias y vertidos de aguas residuales contaminando el ambiente, las aguas, los edificios, inutilizándolos hasta que se efectúe la limpieza adecuada.

1.2.7 Situación de los PCBs en Chile

Ante la evidencia de la toxicidad y persistencia en el ambiente de los PCBs, los países industrializados prohibieron su producción y restringieron su uso. En Chile, recién en 1982, el Gobierno dictó una resolución para ponerle fecha tope al uso de estos fluidos en transformadores. Como no existen en el país operadores de residuos peligrosos habilitados para tratar estos residuos, las empresas han procedido a su exportación. Sin embargo, estos compuestos se siguen empleando, aunque sólo se sabe parcialmente donde se encuentran y cuál es el número de transformadores que aún contienen PCBs. Los PCBs son comúnmente empleados cuando se requieren transformadores resistentes a las llamas, como por ejemplo dentro de edificios o en plantas nucleares (PNUMA, 1999). Existen transformadores a lo largo de las líneas de tensión para bajar el voltaje en los sistemas de distribución y proveer de electricidad a los hogares. La mayoría de los transformadores se encuentra bajo el control de las compañías productoras o distribuidoras de electricidad, pero hay industrias que generan electricidad privadamente y tienen sus propios transformadores, por ejemplo acerías, redes ferroviarias, bases militares, etc. (PNUMA, 1999). A pesar de que se supone que los transformadores son sistemas cerrados, donde los PCBs no deberían estar en contacto con el exterior, la realidad es muy diferente. Ocurren emisiones de PCBs al medio ambiente durante las reparaciones de los equipos, así como también en los frecuentes derrames y explosiones que los involucran.

1.2.8 Normativa para PCBs

Chile, al igual que más de 100 países firmaron en Estocolmo, el 23 de mayo de 2001, un Convenio Internacional en el que se compromete a eliminar los PCBs por su toxicidad y persistencia. El convenio de Estocolmo entró en rigor el 17 de mayo de 2004, y su objetivo es proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes.

Reconociendo que la limpieza de los PCBs y su sustitución por soluciones alternativas más seguras requiere tiempo, dinero y conocimientos técnicos, el Convenio de Estocolmo da a los gobiernos un plazo hasta 2025 para eliminar gradualmente el equipo instalado, tales como transformadores y condensadores eléctricos que contienen PCBs, en la medida en que el equipo se mantenga de una manera que evite los escapes. Los PCBs recuperados deben almacenarse de forma segura o destruirse a más tardar en el año 2028.

CONAMA es punto focal del Convenio de Estocolmo, por esto ha liderado, desde 1999, diversas actividades referidas al estudio de PCBs. Entre las actividades más relevantes desarrolladas por esta entidad se cuenta la edición de un "Manual para el Manejo de PCBs", que incluso será difundido en varios idiomas por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

1.2.9 Actuales tecnologías de destrucción de PCBs

► Incineración

En la actualidad, los desechos con PCBs se destruyen en su gran mayoría por incineración, ya que es una tecnología bien establecida y fácilmente disponible en muchos países industrializados. La incineración convencional implica la oxidación de los desechos para transformarlos en óxidos (CO_2 , H_2O) y residuos inorgánicos que pueden ser descargados al ambiente. El proceso de incineración debe asegurar que los desechos estén expuestos a atmósferas oxidantes a alta temperatura, por eso una de las características más importantes de diseño es el consumo eficiente de combustible. Sin embargo, debe advertirse que ciertos países ya no autorizan esos incineradores porque el proceso de incineración produce dioxinas y furanos (Figura 4).

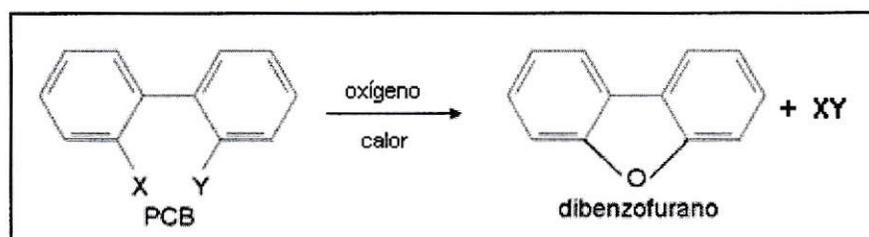


Figura 4: Formación de PCDFs durante la combustión de los PCBs.

► Métodos químicos

El gran problema que existe con la disposición de los PCBs se debe a la naturaleza altamente estable de los enlaces carbono – cloro, esta energía es del orden de los 84 kcal mol^{-1} . Es así que, muchos de los métodos conocidos, tales como clorólisis, deshidrohalogenación catalítica, reacciones con sales fundidas, reacciones con ozono y

reacciones con metales alcalinos permiten solo una deshalogenación parcial. Los procesos basados en reacciones químicas para destruir PCBs se diferencian de los procesos de incineración en que no necesitan altas temperaturas para que ocurran, sino que únicamente del potencial de los compuestos químicos para reaccionar. Muchos de los procesos de dechloración usan reactivo de sodio para separar los átomos de cloro desde la molécula de PCB, como producto se obtiene cloruro de sodio y polifenilos no halogenados. La dechloración catalítica es una tecnología donde los PCBs reaccionan con un álcali hidróxido metálico, un donante de hidrógeno y un catalizador produciendo sales, agua y un residuo carbonoso. La mayoría de las aplicaciones implican la destrucción de PCBs que contaminan aceite mineral, y pueden realizarse a temperatura ambiente o a temperaturas moderadas, y aunque destruyen los PCBs contenidos en el aceite, no destruyen el aceite en sí.

► Métodos biológicos

Los análisis de intentos de degradación de PCBs con bacterias han mostrado que este método está potencialmente limitado debido a sus largos tiempos de retención y a que estos compuestos son extremadamente resistentes a la hidrólisis ácida o básica y a la oxidación. Considerando que su estabilidad varía con la posición y número de los cloruros dentro de la molécula se ha demostrado que algunos congéneres de PCBs son degradados por microorganismos; los más altamente clorados por micro organismos anaeróbicos y los menos clorados por microorganismos aeróbicos. Sin embargo, las tasas de transformación tienden a ser muy lentas, de manera que los compuestos generalmente se consideran resistentes a la biodegradación (Clair N. y col, 2001).

1.3 Tendencias nacionales sobre la disposición de biosólidos

La Comisión Nacional de Medio Ambiente elaboró una normativa que pone a nuestro país al día respecto a los avances en el manejo de lodos de depuradoras. El 17 de enero de 2005 el Consejo Directivo de CONAMA, aprueba el proyecto definitivo de reglamento denominado “Reglamento para el Manejo de Lodos Generados en Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas” (CONAMA, 2005). Este proyecto considera principalmente a los metales pesados y especifica a que valores máximos de concentración pueden encontrarse para la disposición de biosólidos en cursos de agua y en suelos de uso agrícola. Sin embargo, el reglamento no contempla a los contaminantes orgánicos en su marco formativo aunque se sabe que entre un 40% a un 80% del peso seco de los lodos corresponde a materia orgánica, la que presenta sitios activos que permiten la acumulación de compuestos orgánicos, incluso se han caracterizado biosólidos en Estados Unidos y Europa, donde se encontró más de 100 compuestos orgánicos, entre ellos PCBs. Tales razones dan cuenta de la necesidad de hacer una revisión en la legislación nacional para considerar a estos contaminantes en reglamentos futuros.

1.4 Técnicas utilizadas para la extracción de PCBs desde matrices sólidas

En una matriz sólida como es el caso de los biosólidos, existen interacciones analito – matriz de carácter muy complejo y difíciles de predecir, por esto, la etapa de preparación de la muestra donde ocurre el proceso de lixiviación (extracción sólido – líquido) es determinante. La extracción y recuperación de un analito desde una matriz sólida se

puede comprender como un proceso en cinco etapas: desorción del compuesto de los sitios activos de la matriz; difusión del compuesto en la matriz; solubilidad del analito en el extractante; difusión en el extractante; colección de los analitos extraídos.

La metodología convencional utilizada hace más de un siglo para la extracción de muestras sólidas es el sistema Soxhlet, este método se utiliza incluso como referencia para comparar la eficiencia de otras metodologías de extracción. Aún cuando extracciones eficientes se pueden conseguir usando esta técnica simple, las desventajas que presenta el método no son despreciables; principalmente, el tiempo necesario para el proceso es muy largo (16 a 24 horas de extracción) y el consumo de disolvente es muy elevado, pudiendo ocasionar problemas ambientales por su toxicidad. Además, dadas las fuertes interacciones analito – matriz, es posible que una parte de los analitos queden retenidos y sea necesario mejorar las condiciones para llevar a cabo la extracción. Por esto, en el último tiempo se han desarrollado nuevas técnicas entre las que se pueden mencionar; la extracción con fluidos supercríticos (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*). El principio de esta técnica es extraer con un fluido a temperaturas y presiones mayores que las de su punto crítico, el extractante más usado para este método es el CO₂, si bien este extractante posee una baja polaridad, posee al mismo tiempo poca habilidad para desplazar contaminantes orgánicos como los PCBs desde sitios activos de la matriz, lo que impide extraer de manera eficiente este tipo de analitos (Hawthorne S. y col, 1994). La extracción asistida con microondas (MAE, *Microwave Assisted Extraction*) es otra técnica desarrollada, donde se utiliza la energía de las microondas para promover la rotación molecular de un disolvente donde se establece un dipolo permanente y el calor

producido se conduce hacia la muestra. Una extracción eficiente de PCBs con esta técnica está limitada por la baja polaridad del disolvente necesaria para extraer estos analitos. Básicamente, cuanto mayor sea la constante dieléctrica del disolvente, mayor será la capacidad de éste para absorber la energía proporcionada por las microondas (Sporring S. y col, 2005).

La extracción con líquidos presurizados (PLE, *Pressurized Liquid Extraction*), mayormente conocida como ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) constituye una técnica de lixiviación discontinua basada en el uso de disolventes orgánicos presurizados por calentamiento convencional en un horno, lo que promueve un aumento de la cinética de desorción de los compuestos desde la matriz. Este modo de extracción se ha empleado en la extracción de PCBs, PAHs, herbicidas clorados, pesticidas, etc., presentando como inconveniente principal extracciones poco selectivas.

Otra metodología es la extracción con agua subcrítica (SWE, *Subcritical Water Extraction*), su fundamento se basa en que el agua en condiciones normales es demasiado polar para solvatar de manera efectiva a compuestos no polares, pero si se sobrecalienta a temperaturas entre los 200 – 280°C a presiones sobre los 1000 psi (presión suficiente para mantenerla en estado líquida), el agua reduce su polaridad a valores muy cercanos a los disolventes orgánicos comunes, como es el metanol (Abramowicz, 1990).

La extracción con disolvente presurizado (PSE, *Pressurised Solvent Extraction*), es considerada una buena alternativa comparada con la técnica tradicional Soxhlet para la lixiviación de contaminantes orgánicos, dado que se obtienen extracciones cuantitativas

en menores tiempos. Luego, la extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido (PSE - US, *Pressurized Solvent Extraction Assisted Ultra-sound*) es una alternativa que consiste en aplicar energía acústica a la extracción y de esta manera se debilitan las interacciones analito – matriz y se optimiza la eficiencia de extracción. Estas dos últimas técnicas son utilizadas en este trabajo, las que serán descritas con mayor detalle posteriormente.

En resumen, cuando un analito de interés se encuentra fuertemente unido a la matriz, la extracción convencional Soxhlet no proporciona la energía suficiente para separarlo de ella, situación contraria ocurre en determinadas condiciones de trabajo de algunas de las técnicas alternativas mencionadas. Así, los nuevos métodos de lixiviación debido a la operación con temperaturas y presiones más elevadas estimulan una extracción más eficiente, además de los ahorros en tiempo y disolvente.

1.4.1 Extracción con disolvente presurizado (PSE)

Contaminantes orgánicos de baja polaridad, como los PCBs, son fácilmente adsorbidos por el alto porcentaje de materia orgánica presente en biosólidos, se establecen fuertes interacciones analito – matriz del tipo van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, enlaces π , interacciones dipolo – dipolo, reacciones de intercambio de ligantes y quimisorción. Así, la principal limitación de la técnica tradicional Soxhlet es liberar a los analitos enlazados en la matriz en un tiempo razonable.

Si bien métodos como SFE o ASE, promueven extracciones eficientes, estas técnicas tienen como limitante el hecho de que la extracción se lleva a cabo en forma discontinua. Por el contrario, la extracción con disolvente presurizado (PSE) involucra un contacto permanente entre la muestra y el disolvente, facilitando la extracción sólido – líquido, producto de un gradiente de concentración. El uso de disolvente a alta temperatura y presión proporciona energía adicional a la extracción, de este modo un mayor porcentaje de los analitos de interés son liberados desde la matriz, esto ocurre debido a tres razones principales. Primero, temperaturas elevadas aumentan la capacidad del disolvente al solubilizar los analitos. El incremento de la temperatura estimula el rompimiento de las interacciones soluto – matriz, la energía térmica puede vencer interacciones cohesivas (soluto – soluto) y adhesivas (soluto – matriz), debido a que la energía de activación requerida para los procesos de desorción disminuyen. En suma, las interacciones intermoleculares son debilitadas con el incremento de temperatura (Pimental, 1960)¹. Las altas temperaturas también disminuyen la viscosidad del disolvente líquido (a presiones constantes), permitiendo una mayor penetración a la matriz, lo que mejora la extracción. Además de reducir la viscosidad, por incremento de la temperatura también decrece la tensión superficial del disolvente, matriz y solutos, permitiendo al disolvente unirse mejor a la matriz. Ambos cambios facilitan mejor el contacto de los analitos con el disolvente, mejorando la eficiencia de extracción. Segundo, por efecto del incremento en la temperatura, la razón de difusión aumenta. Se ha mostrado que la razón de difusión incrementa aproximadamente 2 a 10 veces por el aumento de la temperatura desde 25 a 150 °C (Perry R. y col, 1997)². Finalmente y en tercer lugar, la transferencia de masa mejora y por ende, la eficiencia de extracción, ya

que se produce un constante contacto entre la muestra y el disolvente fresco (Richter B., 1996).

^{1,2} Bibliografía citada por el autor Richter B.

1.4.2 Extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido (PSE - US)

A través de la energía mecánica producto de vibraciones acústicas (con frecuencia de 35 KHz) se generan condiciones de alta presión y temperatura, las que ayudan a romper las uniones moleculares de los analitos con la matriz. Cuando estas vibraciones son transmitidas a través del líquido, ocurren una serie de cavitaciones y se forman burbujas con presiones negativas. Los compuestos químicos y partículas son removidos mecánicamente desde la superficie de la matriz y desde los sitios de adsorción, por ondas de choques generadas cuando colapsan estas burbujas. Debido a esto, la sonicación puede ser usada para descomponer u oxidar compuestos orgánicos. Por lo tanto, al desarrollar estos métodos de extracción, hay que tener cuidado y evitar la degradación de los analitos. La extracción dinámica puede ser ventajosa en este aspecto, porque los analitos son extraídos e inmediatamente transferidos desde la matriz sólida hasta el disolvente, siendo eliminados rápidamente de la celda de extracción (Sánchez, 2002).

1.4.3 Variables que afectan el proceso de extracción

El grado de eficiencia en la extracción estará determinado por parámetros experimentales que pueden ser ajustados. En este contexto, se puede distinguir entre variables continuas y discretas. La variable discreta más importante es la naturaleza del

disolvente utilizado. Entre las variables continuas destacan temperatura, tiempo de extracción y flujo (Morales, 2003). El tiempo de extracción influye directamente sobre el contacto que establece el extractante con la muestra, así cuando se trata de compuestos con alta masa molar, que tienden a ser mayormente retenidos en la matriz, los tiempos de extracción deben extenderse para conseguir liberar a los analitos de interés.

Las propiedades de la muestra también interfieren sobre la velocidad de la extracción (naturaleza de la matriz, porosidad, volumen de la superficie de contacto, tamaño, entre otras). En la etapa de difusión, el tamaño de las partículas es relevante, pues a medida que el tamaño de la partícula disminuye, el área de contacto de la muestra aumenta y se obtienen mejores extracciones. Por lo tanto, el pre – tratamiento de la muestra (molienda, tamizado) debe efectuarse con cuidado. La facilidad de separación variará si los analitos a ser extraídos se encuentran depositados, adsorbidos o químicamente unidos a la matriz de la muestra. También es relevante la situación en que se encuentran los analitos y la porosidad de la muestra. Las recuperaciones son normalmente mejores en muestras porosas y con analitos situados en la superficie (Morales, 2003).

1.5 Determinación mediante GC- MS

Para la determinación de contaminantes orgánicos, se utilizan principalmente técnicas cromatográficas, entre las técnicas analíticas desarrolladas en este último tiempo, se pueden citar la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*) y la cromatografía líquida de alta eficiencia

acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS, *High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*). Dadas las propiedades físico-químicas de los analitos de interés en este trabajo, se utilizó la técnica GC – MS.

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos, en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna. Existen tres técnicas básicas de inyección de muestras (líquidas o gaseosas) en columnas capilares: “split”, “split-less” y “on column”. Las dos primeras consisten en inyectar y vaporizar la muestra en una cámara de vaporización. El sistema “split” desvía la mayor parte de la muestra fuera del sistema cromatográfico y envía sólo una pequeña fracción a la columna. El método “split-less” dirige toda la muestra a la columna, por lo que resulta más adecuado para el análisis de trazas o de componentes muy volátiles. La inyección “on column” se lleva a cabo en frío, eliminando la etapa de vaporización que podría producir la descomposición de los compuestos termolábiles.

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Sus principales cualidades son:

- ▶ Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- ▶ Permite medir cuantitativamente la concentración de los compuestos.
- ▶ Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de $\mu\text{g kg}^{-1}$ o ng kg^{-1} y en casos específicos se puede llegar hasta pg kg^{-1} .
- ▶ Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- ▶ Suministra información isotópica.
- ▶ Es una técnica rápida.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado.

1.5.1 Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es una herramienta muy potente para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja.

La espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC y MS da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas. De esta manera, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma de la corrida total de iones (TIC, *Total Ion Current*). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos,

algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección mediante el registro selectivo de iones (SIR, *Selected Ion Recording*). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones, así aumenta la sensibilidad del método y se reducen las interferencias (Casas J. M. y col, 1994).

1.6 Diseño estadístico de experimentos

Como el objetivo de una investigación es obtener información de calidad, la experimentación se debe diseñar cuidadosamente, en orden a realizar la menor cantidad de experimentos y así minimizar los costos. En este sentido, la estadística es la disciplina que cuenta con las herramientas para realizar diseños experimentales y evaluar estos resultados.

Estos diseños se aplican a sistemas en los cuales se observa una o más de una variable experimental dependiente (o respuesta), cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes controladas llamadas factores. Se pretende con este tipo de diseño determinar la influencia de los factores sobre la respuesta observada, establecer cuales factores influyen más y como interaccionan entre ellos, además de optimizar respuestas, verificando los valores de los factores que proporcionan aquella de mayor calidad.

El diseño experimental muestra el marco que permite variar más de un factor simultáneamente, estableciendo la mínima cantidad de experimentos para obtener la máxima eficiencia. Las matrices de Hadamard permiten estudiar el efecto de $N-1$ factores con sólo N experimentos. Una vez que se han identificado los factores más importantes, el siguiente paso suele ser estudiar cuantitativamente su efecto sobre la respuesta y sus interacciones.

Para conocer que valores de los factores proporcionan respuestas con la calidad deseada se realiza una optimización. Estos valores se pueden conocer calculando un modelo matemático denominado superficie de respuesta, que relaciona los factores más relevantes con las respuestas.

Una vez que se dispone de los resultados experimentales se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Los tests estadísticos permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental. Si se construye un modelo de superficies de respuesta, se pueden calcular los coeficientes por el método de los mínimos cuadrados y evaluar el modelo realizando réplicas de ciertos experimentos, aplicando el test ANOVA. El modelo se puede utilizar para buscar matemáticamente la zona óptima (Massart D.L. y col, 1997).

II. HIPÓTESIS

En el área medioambiental, los análisis de muestras requieren largos procedimientos para establecer la presencia y cantidad de un determinado contaminante. La incorporación de energía adicional (temperatura, presión del disolvente y ultrasonido) permitirá aumentar la eficiencia de extracción (en términos de recuperación y rapidez) de PCBs desde biosólidos, respecto de un sistema de extracción Soxhlet convencional.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- ▶ Desarrollar un método de extracción de PCBs desde lodos sanitarios utilizando la técnica de disolvente presurizado asistida por ultrasonido.

3.2 Objetivos específicos

- ▶ Utilizar la técnica GC-MS y el método de separación de PCBs ya implementado en el laboratorio, con el objeto de realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los analitos de interés en este estudio.
- ▶ Estudiar las condiciones óptimas para el desarrollo de una nueva metodología de extracción de PCBs desde biosólidos, basada en el uso de disolventes presurizados y ultrasonido, en continuo.
- ▶ Utilizar un programa estadístico Statgraphics 5.0 para el análisis y procesamiento de datos, lo que permitirá realizar el diseño experimental.
- ▶ Validar el método optimizado con respecto a parámetros analíticos (determinación de precisión, sensibilidad, % de recuperación, límites de detección y cuantificación).
- ▶ Comparar el método propuesto con la metodología estándar de extracción Soxhlet.
- ▶ Aplicar el método a muestras reales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Reactivos

- ▶ Agua destilada grado reactivo.
- ▶ Acetona grado GC, Merck.
- ▶ Diclorometano grado HPLC, Fisher Scientific.
- ▶ Sulfato de Sodio anhidro, grado PA, de Merck.
- ▶ n –hexano grado HPLC, Fisher Scientific.
- ▶ Sílica Gel, grado 923, 100 – 200 mesh, de Sigma – Aldrich.
- ▶ Lana de vidrio con Silano, de Chromatography Research Supplies, Inc.
- ▶ Metanol grado cromatográfico, Merck.
- ▶ Nitrógeno extrapuro, AGA.
- ▶ Hexaclorobenceno SUEPLCO, Bellefonte, PA, USA.
- ▶ Estándar de PCB, Aroclor 1254 de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Metanol, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA.
- ▶ Estándar de PCB, Aroclor 1260 de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en Metanol, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA).

4.1.2 Materiales

- ▶ Materiales de vidrio de uso general, volumétrico (clase A).
- ▶ Tubos de vidrio con tapas roscas teflón 30 - 40 mL.
- ▶ Viales de vidrio ámbar con tapas roscas teflón 4 mL.

- ▶ Jeringas GC y HPLC 10-100 μL – 1000 μL , Hamilton.
- ▶ Mortero de ágata.
- ▶ Papel para pesar, Scientific Products.
- ▶ Teflón.
- ▶ Columna de vidrio para secar extractos.
- ▶ Sistema concentrador Kuderna – Danish, SUPELCO:
 - Balón Kuderna Danish de 500 mL.
 - Columna Snyder de 3 balines con junta esmerilada.
 - Tubos concentradores graduados de 10 y 15 mL.
 - Baño de agua termorregulado.
 - Campana extractora.
- ▶ Sistema de limpieza y purificación (cleanup):
 - Sistema de vacío para extracción en fase sólida, SUPELCO (Manifold).
 - Columnas para extracción en fase sólida.
- ▶ Sistema extractor Soxhlet:
 - Extractor.
 - Refrigerante de reflujo.
 - Balón de destilación de 500 mL.
 - Manto calefactor Bibby.
 - Dedales de extracción Soxhlet, grado N° 84, diámetro 33 x 80 mm; Advantec MFS, Inc.
- ▶ Sistema de extracción con disolvente presurizado (PSE):

- Celda de extracción: columna de acero inoxidable HPLC, SUPELCO, sin relleno, 15 x 0,5 cm, 12 mm I.D.
- Pre – calentador: 3 m de tubo de acero inoxidable, SUPELCO, SS – 316, 1/16”, 0,1 mm I.D.
- Enfriador: 1 m de tubo enrollado de acero inoxidable, SUPELCO, SS – 316, 1/16”, 0.1 mm I.D.
- Válvula de acero inoxidable, Swagelok (presión máxima 6000 psi).
- Conexiones SUPELCO (férulas, tornillos, fritas, uniones, etc.).

4.1.3 Equipos

- ▶ Balanza Analítica 125 A ($\pm 0,0001$ g de precisión).
- ▶ Agitador recíproco Heidolph modelo Promax.
- ▶ Autovortex Mixer Vision S.A KMC-1300V SA5.
- ▶ Estufas de secado WTE Binder.
- ▶ Sistema extracción con disolvente presurizado (PSE):
 - Horno de aluminio (28 x 12 x 5 cm).
 - Sistema eléctrico para control de temperatura del horno (rango de trabajo entre 25 y 400°C).
 - Bomba para HPLC modelo Perkin Elmer, serie 200 Ic pump.
 - Baño de ultrasonido (35 KHz), con control de temperatura hasta 70°C.
- ▶ Cromatógrafo de gases HP 5890 Series II acoplado a un Espectrómetro de Masa cuadrupolar Fisons MD 800.

4.2 Preparación de la muestra

La muestra de referencia para los estudios de optimización se preparó tomando 20 gramos de biosólido (proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la Región Metropolitana “El Trebal”), sobre éste se agregó diclorometano, se adicionaron alícuotas de 1 mL de estándares certificados (medida con jeringa de 1000 μL) de Aroclor 1254 y 1260 ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). A modo de incorporar los analitos en la matriz, se agitó constantemente (reponiendo el disolvente) durante 48 horas, se secó a temperatura ambiente y se sometió a molienda en un mortero de ágata para homogenizar. Finalmente, la muestra se incubó durante un mes en refrigerador a 4°C .

4.3 Procedimiento para la extracción con disolvente presurizado (PSE)

La extracción de los analitos desde la matriz de biosólido se realizó utilizando el sistema que se muestra en la Figura 5. Principalmente el sistema se compone de una bomba HPLC, cuya función es mantener el flujo constante, soporta una presión máxima de 6000 psi; horno de aluminio con controlador de temperatura; pre - calentador, que consiste en tres metros de tubo de acero inoxidable enrollado, se usa para mantener el disolvente a la temperatura en que se lleva a cabo la extracción; celda de extracción, dentro de la cual se dispone la muestra y ocurre el proceso de extracción sólido – líquido; enfriador, que corresponde a un tubo de un metro de acero inoxidable enrollado y sumergido en agua para enfriar los extractos y una válvula que permite regular la presión del sistema. El procedimiento experimental que se utilizó para la extracción PSE se describe a continuación:

- ▶ Se encendió el horno y se ajustó la temperatura (variable a estudiar) a la que se efectuó la extracción.
- ▶ Se agregó la muestra (500 mg) a la celda de extracción, antes de cerrarla se llenó con la mezcla de disolvente utilizado (acetona /diclorometano, 1:1 v/v).
- ▶ Se encendió la bomba HPLC y se purgó el sistema.
- ▶ Se acomodó la celda de extracción en el interior del horno y se conectó con el sistema.
- ▶ Se ajustó el flujo (2 mL min^{-1}), se abrió la válvula y se reguló la presión a la que se realizó la extracción ($1800 \pm 100 \text{ psi}$), se cerró la válvula y se mantuvo presurizado el sistema. Esta etapa corresponde a la de extracción estática, cuyo tiempo se debió optimizar.
- ▶ Una vez transcurrido el tiempo estático, se inició la etapa dinámica (variable a optimizar) y se cuidó que la presión del sistema se mantuviera en los rangos especificados.
- ▶ Se colectó el extracto en un tubo y se guardó en refrigerador para los análisis posteriores.

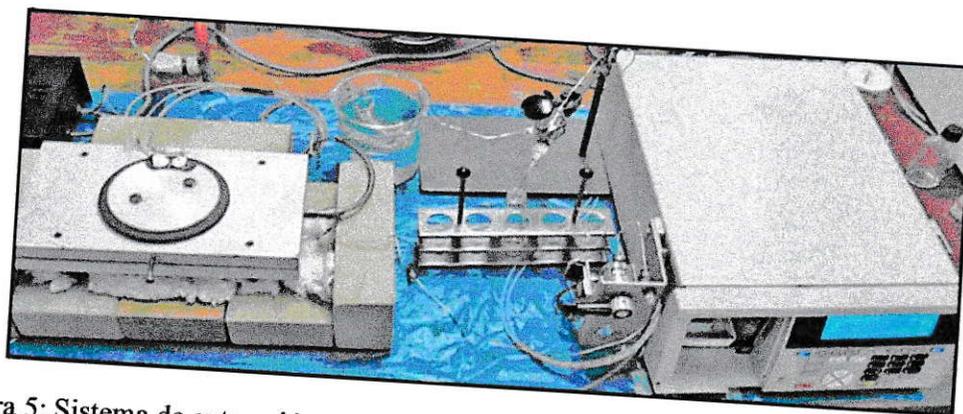


Figura 5: Sistema de extracción con disolvente presurizado (PSE).

4.4 Procedimiento para la extracción con disolvente presurizado asistida con ultrasonido (PSE - US)

El procedimiento que se usó para la extracción con ultrasonido es el mismo que se describe en la sección anterior, la única variación en el montaje del sistema es el reemplazo del horno de aluminio por un baño de ultrasonido, cuya temperatura puede ser regulada. La Figura 6 muestra el baño de ultrasonido utilizado.

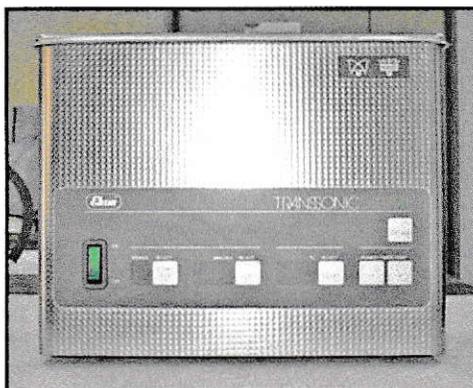


Figura 6: Baño de ultrasonido usado en la extracción de PCBs.

4.5 Procedimiento para secar el extracto

Una vez que se obtuvo el extracto se pasó por una columna de vidrio provista de 10 cm de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), con la finalidad de eliminar el agua que pudiera haber quedado en el extracto, previamente el sulfato de sodio se calentó a 400°C durante 4 horas (Method 3540C, USEPA). En la Figura 7 se muestra el sistema utilizado.

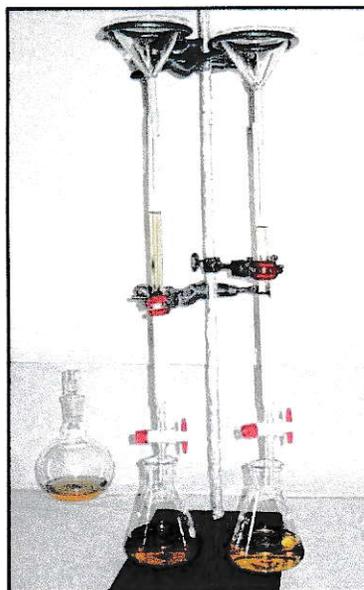


Figura 7: Sistema para secar los extractos.

4.6 Procedimiento para la concentración del extracto

- ▶ Primero se conectó el tubo concentrador al balón del Kuderna Danish, previo a la adición de piedras de ebullición.
- ▶ Se agregó la muestra al balón del Kuderna Danish y se ajustó la columna Snyder al balón.
- ▶ Se instaló el sistema en un baño de agua a 80 °C y se sumergió el tubo concentrador.
- ▶ Se concentró la muestra hasta obtener un volumen aparente de 2 mL.
- ▶ Se realizó un cambio de disolvente, de la mezcla acetona/diclorometano 1:1 v/v a n- hexano, para esto se adicionaron 20 mL de n – hexano al sistema Kuderna Danish, con el baño de agua ajustado a 90 °C.
- ▶ Finalmente, la muestra se concentró a 2 mL.

El sistema se presenta en la Figura 8 y el procedimiento está descrito por la USEPA, Method 3540C.



Figura 8: Sistema concentrador Kuderna Danish.

4.7 Procedimiento de limpieza del extracto

Se utilizó el método de limpieza (cleanup) mediante sílica gel recomendado por la USEPA (Method 3630C, USEPA). Primero se activó la sílica, para ello se calentó durante 16 horas en un recipiente de vidrio a 130 °C, con esto se persigue eliminar la presencia de hidrocarburos clorados, pesticidas, etc. Las etapas de este procedimiento se describen a continuación:

- ▶ Se conectó el sistema al vacío y se ajustó con teflón la columna en la válvula.
- ▶ Se puso lana de vidrio en la columna.
- ▶ Se agregaron a la columna 3 gramos de sílica gel disueltos con n- hexano.
- ▶ Se adicionaron a la columna 2 cm de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

- ▶ Se ambientó la columna con 10 mL de n- hexano, para esto se reguló el flujo a 5mL min⁻¹ y luego se colectó el eluato que es descartado.
- ▶ Se agregó la muestra a la columna (reducida previamente a 2 mL), se eluyó con 80 mL de n – hexano y el eluato se colectó en tubos limpios.
- ▶ La columna no debe quedar seca.
- ▶ El extracto limpio se concentró mediante burbujeo con N₂ hasta 1 mL y se empacó en un vial para adicionar estándar interno y leer en GC – MS.

La Figura 9 muestra una secuencia de fotografías que dan cuenta del proceso para la limpieza, desde que está montado el sistema hasta que se obtienen los extractos limpios.

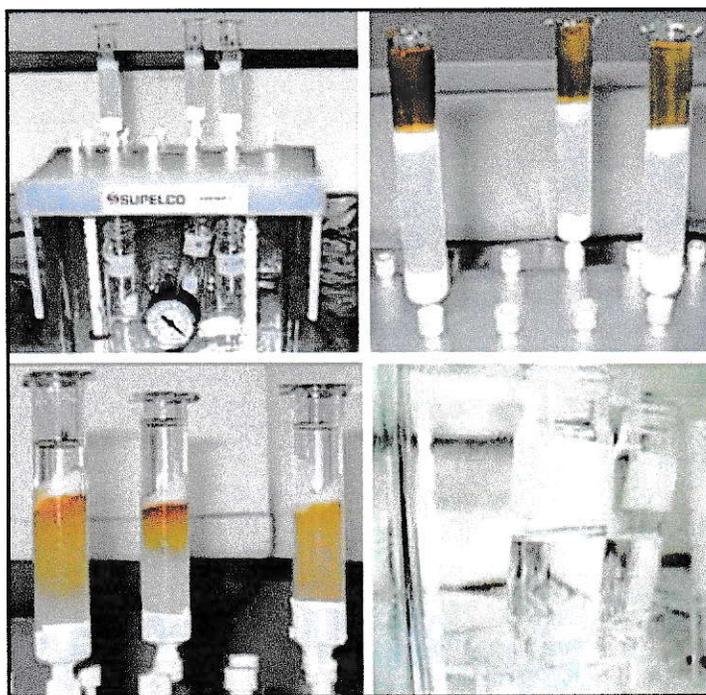


Figura 9: Limpieza de los extractos mediante sílica gel.

4.8 Procedimiento de extracción Soxhlet

Se procedió tal y como indica USEPA, método 3540C. Se montó el sistema según muestra la Figura 10 y se realizó el siguiente procedimiento:

- ▶ Se pesaron 3 gramos de la muestra de biosólido y 3 gramos de sulfato de sodio anhidro, se mezcló y se colocó en el dedal de extracción.
- ▶ En un balón de 500 mL se agregaron 300 mL de disolvente (acetona/ diclorometano, 1:1 v/v).
- ▶ Se reguló la temperatura con un manto calefactor hasta obtener entre 4 a 6 ciclos por hora y se realizó la extracción por 24 horas.
- ▶ Una vez obtenido el extracto, se concentró a 2 mL, de ese volumen se tomó una alícuota correspondiente a la sexta parte (0,333 mL), medida con una jeringa de 1000 μ L para llevar a cabo el procedimiento de limpieza.

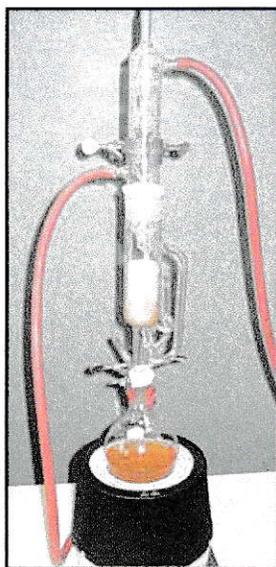


Figura 10: Sistema de extracción Soxhlet.

4.9 Procedimiento para el análisis de PCBs

4.9.1 Preparación de Estándares

A partir del estándar de Aroclor 1254 y 1260 se realizaron seis diluciones empleando metanol como disolvente, en un rango de concentración en el cual se estimaba se encontraría la concentración de las muestras ($1 - 30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4.9.2 Estándar Interno

Se usó hexaclorobenceno como estándar interno a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para normalizar las áreas de respuesta en el instrumento.

4.9.3 Procedimiento GC – MS

Se utilizó una columna del tipo ZB 5 ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$). Para la determinación de los distintos homólogos de PCBs se empleó un método por espectrometría de masas que usa la modalidad de registro selectivo de iones (SIR), este método se validó previamente en el laboratorio (Toledo C., 2006). El equipo que se usó para llevar a cabo la determinación de PCBs se muestra en la Figura 11.

Las condiciones en las cuales se usó el cromatógrafo de gases se describen a continuación:

- ▶ Gas portador: Helio.
- ▶ Temperatura inicial del horno: $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

- ▶ Temperatura inyección: 250 °C.
- ▶ Presión: 15 psi.
- ▶ Volumen inyección: 1 µL.
- ▶ Tipo inyección: splitless.
- ▶ Programa de Temperatura: 80 °C (0 min) – 10 °C min⁻¹ – 280 °C (5 min).

El detector de masa se ajustó para ser usado en las siguientes condiciones:

- ▶ Temperatura de detección: 280°C.
- ▶ Modo analítico: SIR.
- ▶ Fuente cuadrupolo: 280°C.

Para la identificación de los analitos se usó el programa de iones que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Iones de cuantificación y confirmación de los distintos homólogos de PCBs.

Tipo de * Homólogo	di	tri	tetra	penta	hexa	hepta	HCB EI
Ión de Cuantificación	222	256	292	326	360	394	284
Ión de Confirmación	224	258	290	324	362	396	286

* Los prefijos indican el grado de cloración de los distintos homólogos de PCBs.

Se tomaron 2 iones para monitorear cada analito (cada tipo de homólogo de PCB). El ión de cuantificación es el que registró mayor intensidad en el espectro, seguido del ión de confirmación, se trata de pares isotópicos de iones (M y M^{+2}) en los que la variación de la masa depende de la presencia de Cl_{35} o Cl_{37} .

Para los estudios de optimización se integraron 3 señales de cada grupo de PCBs, tomando aquellas con áreas más representativas. Estas señales se identificaron en todos los análisis por su tiempo de retención y se comprobaron con sus espectros respectivos. Luego, la respuesta se expresa como la sumatoria de las señales correspondientes a cada familia de PCBs.

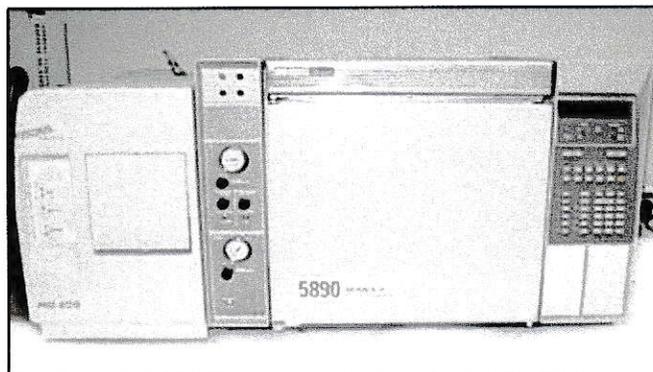


Figura 11: Cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masa.

4.10 Procedimiento para el diseño experimental

Mediante el software estadístico StatGraphics Plus 5.1 para Windows y considerando las variables; temperatura del horno, tiempo estático y tiempo dinámico, se realizó un diseño factorial fraccionario (2^3) de screening para evaluar la significancia estadística de estas variables durante la extracción de PCBs desde la matriz.

Tabla 4: Diseño experimental del tipo screening 2^3 exp + 3 center point.

Factor	Nivel		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	50	125	200
Tiempo dinámico (min)	5	17,5	30
Tiempo estático (min)	0	10	20

En la Tabla 4 el nivel -1 indica el menor valor asociado a la variable a estudiar, el nivel +1 indica el valor máximo y el nivel 0 el valor medio. Por lo tanto, se conforma una matriz como se muestra en la Tabla 5 donde se muestran las combinaciones de experimentos a realizar para obtener las distintas respuestas (área analito/ estándar interno).

Tabla 5: Matriz de experimentos para un diseño factorial del tipo screening 2^3 experimentos + 3 puntos centrales.

Nº Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo dinámico (min)	Tiempo estático (min)
1	- 1	- 1	- 1
2	1	- 1	- 1
3	- 1	1	- 1
4	1	1	- 1
5	- 1	- 1	1
6	1	- 1	1
7	- 1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la etapa de optimización del método de extracción, se realizó un análisis por familias isoméricas de PCBs, el reconocimiento de los distintos congéneres se hizo mediante sus iones característicos (m/z).

En la Figura 12 se muestra un cromatograma obtenido para una solución de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada con una mezcla de estándares certificados de Aroclor 1254 y Aroclor 1260.

Luego, en la Figura 13 se presentan los cromatogramas obtenidos para los iones de las distintas familias de PCBs consideradas en el programa SIR.

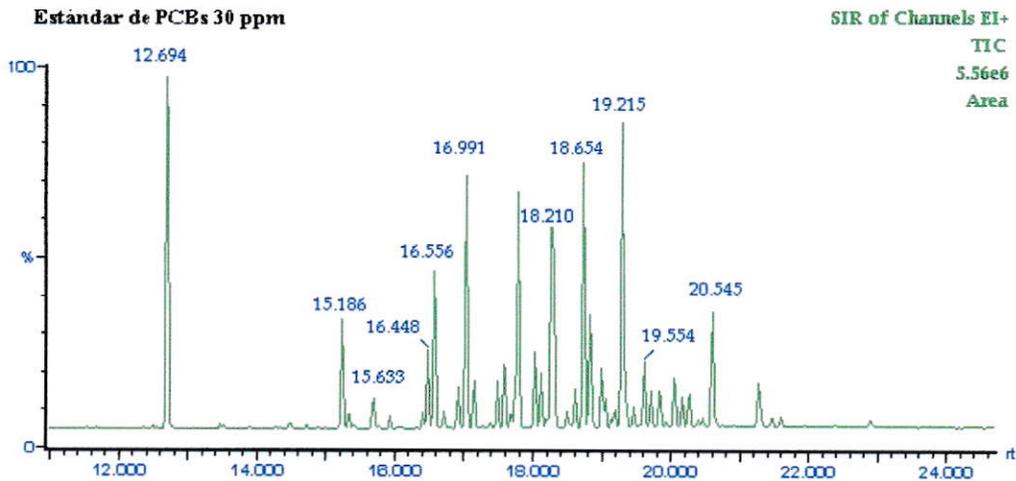


Figura 12: Cromatograma de estándar PCBs, $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Aroclor 1254 y Aroclor 1260).

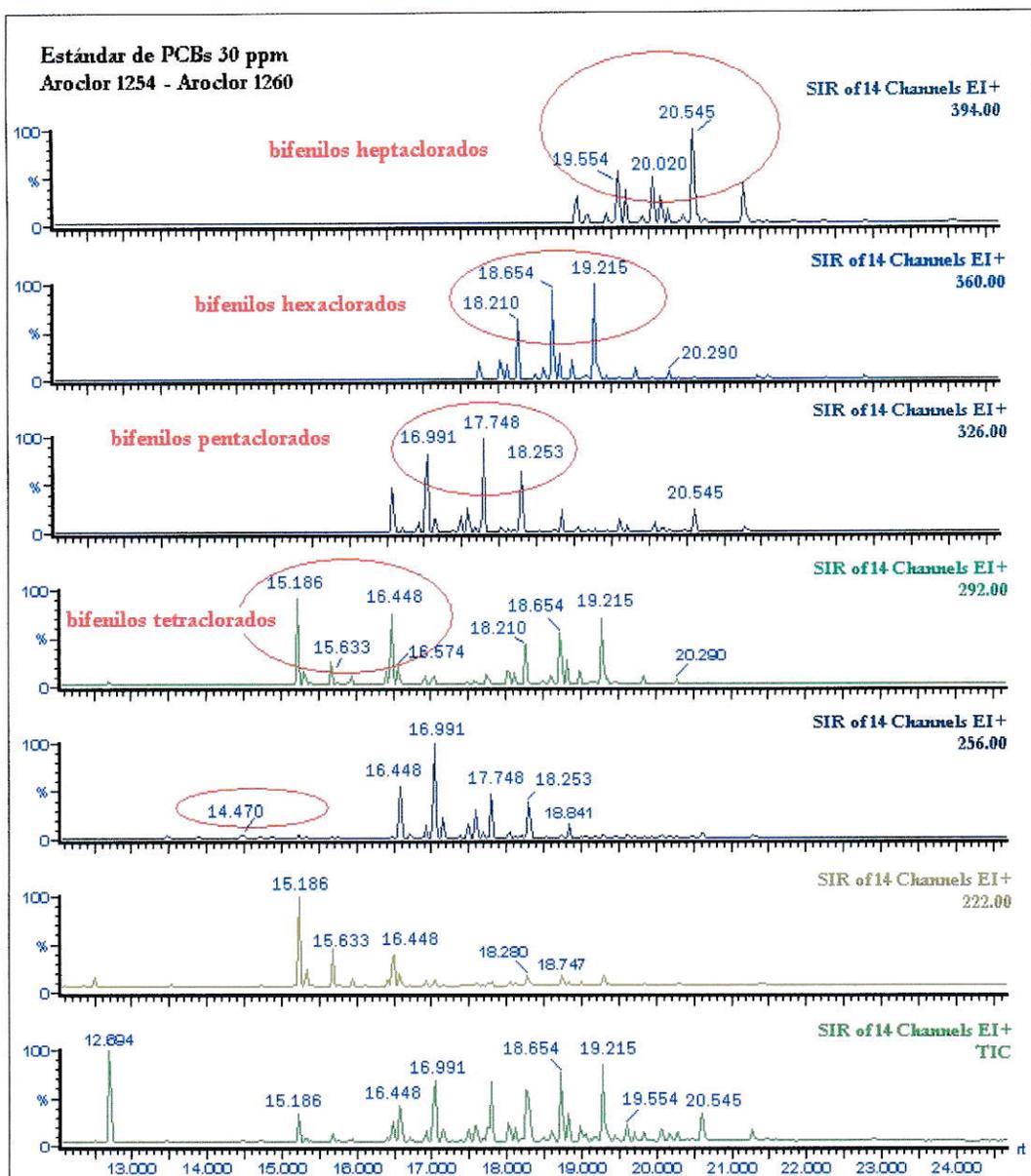


Figura 13: Cromatogramas de todos los iones de PCBs.

Al observar los cromatogramas para los iones con m/z 256 y 222 se puede notar que los estándares contienen muy bajos porcentajes de estos homólogos de PCBs (bifenilos di y triclorados). En cambio, los cromatogramas para los iones con m/z 394, 360, 326 y 292 muestran la presencia representativa de bifenilos tetraclorados, pentaclorados, hexaclorados y heptaclorados en la mezcla de estándares. Por este motivo, el estudio se centró en estos cuatro homólogos. El método que se desarrolló para la cuantificación de analitos radica en la elección de tres picos característicos de cada homólogo y el criterio que se usó para escogerlos fue que tuvieran a lo menos un 25% del área de los picos más altos de cada homólogo. La Figura 14 muestra gráficamente la selección de los picos para el hexaclorobifenilo y la Tabla 6 resume los valores en términos del tiempo de retención de los picos seleccionados para las cuatro familias de PCBs estudiadas.

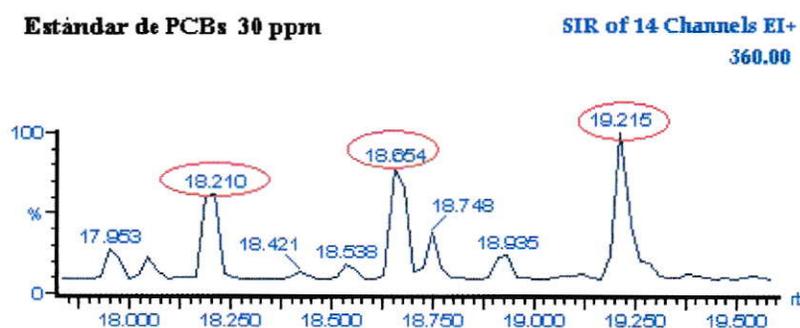


Figura 14: Cromatograma con picos representativos del hexaclorobifenilo ($m/z = 360$).

Tabla 6: Tiempos de retención para los picos de los distintos homólogos de PCBs.

Homólogo de PCBs	Ión Cuantificación (m/z)	t _R pico A	t _R pico B	t _R pico C
tetraclorobifenilo	292	15186	15633	16448
pentaclorobifenilo	326	16991	17748	18253
hexaclorobifenilo	360	18210	18654	19215
heptaclorobifenilo	394	19554	20020	20545

5.1 Determinación de las variables estadísticamente significativas

El estudio de las condiciones óptimas para la nueva metodología de extracción de PCBs desde biosólidos sanitarios, implicó evaluar la significancia estadística de las variables que influyen mayormente en el proceso, entre ellas se contaron la temperatura del horno, tiempo estático y tiempo dinámico de extracción. La Tabla 7 muestra la matriz de respuesta de los distintos experimentos definidos por el diseño fraccionado de dos niveles para las tres variables. Se debe especificar que la respuesta se planteó como la sumatoria de las áreas cromatográficas de las señales consideradas en el análisis, normalizada con el estándar interno.

Tabla 7: Matriz de Respuesta (área analito/área estándar interno) para el diseño experimental fraccionado de dos niveles para las tres variables.

Nº Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo dinámico (min)	Tiempo estático (min)	Respuesta
1	50	5	0	0,032
2	200	5	0	0,140
3	50	30	0	1,519
4	200	30	0	1,405
5	50	5	20	0,744
6	200	5	20	0,097
7	50	30	20	0,984
8	200	30	20	1,086
9	125	17,5	10	1,098
10	125	17,5	10	1,134
11	125	17,5	10	1,166

A partir de los resultados expresados en la matriz de respuesta (Tabla 7), se realizó un estudio sobre las interacciones que se producen entre las variables estudiadas y se estableció cual de ellas tiene una significancia relevante sobre la eficiencia de extracción de PCBs desde la matriz de biosólidos.

En el diagrama de Pareto (Figura 15) se observa que solamente el tiempo dinámico de extracción traspasa la línea roja vertical que grafica el 95% de significancia ($\alpha = 0,05$), por tal razón se distinguió como variable a optimizar.

La Tabla 8 muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones entre las variables, además del error normal de cada uno de los efectos, cuyo valor representa el error de muestreo (valores en orden decreciente de importancia).

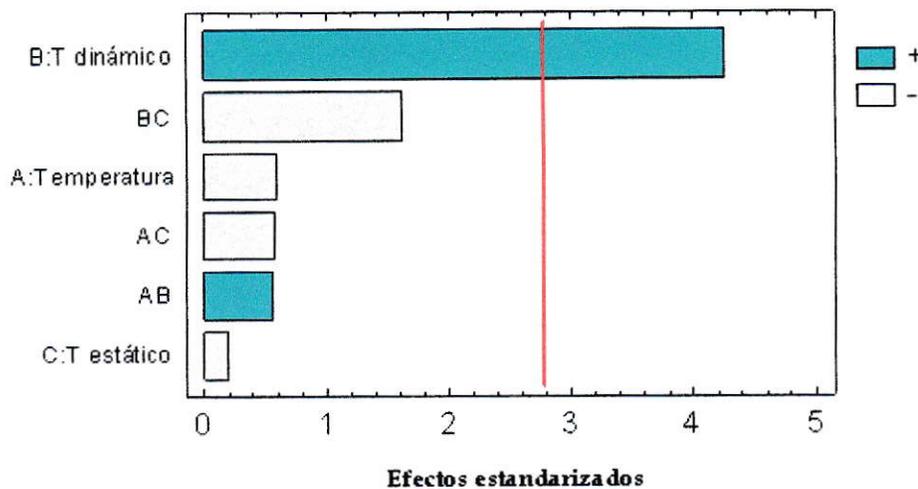


Figura 15: Gráfico de Pareto estandarizado para los efectos entre las variables.

Tabla 8: Efectos estimados para la respuesta.

Promedio	0,855 ± 0,099
B [Tiempo dinámico]	0,995 ± 0,234
A:B [Temperatura: Tiempo dinámico]	0,131 ± 0,234
B:C [Tiempo dinámico: Tiempo estático]	-0,380 ± 0,234
A [Temperatura]	-0,137 ± 0,234
A:C [Temperatura: Tiempo estático]	-0,134 ± 0,234
C [Tiempo estático]	-0,046 ± 0,234

Quedó en evidencia que el tiempo dinámico es la variable con mayor importancia y en interacción con la temperatura presentaron los dos únicos efectos positivos. El resto de las variables y sus combinaciones presentaron efectos negativos. Se probó la significación estadística de los efectos mediante un análisis ANOVA, donde se dividió la variabilidad en razón de áreas en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. Como se observa en la Tabla 9 sólo uno de los efectos (factor B: tiempo

dinámico) presentó un p-valor inferior a 0,05; lo que indica que es significativamente distinto de cero al 95% de nivel de confianza.

Tabla 9: Análisis de varianza para la respuesta.

Fuente	p - valor
B [Tiempo dinámico]	0,0131
A:B [Temperatura: Tiempo dinámico]	0,6035
B:C [Tiempo dinámico: Tiempo estático]	0,1791
A [Temperatura]	0,5878
A:C [Temperatura: Tiempo estático]	0,5956
C [Tiempo estático]	0,8530

Con este estudio se logró establecer que sólo el tiempo dinámico es una variable estadísticamente significativa. Del mismo modo, se ha encontrado en otros estudios para la extracción PSE de compuestos orgánicos desde una matriz sólida, que esta variable tiene una importancia muy alta sobre la eficiencia de extracción (Richter P. y col, 2006). Sin embargo, además de conocer las variables que tienen importancia en el proceso de extracción se planteó obtener una respuesta optimizada, para ello se optó por un análisis univariado que permitiera obtener una respuesta con la calidad deseada.

Antes de optimizar el tiempo dinámico, se decidió realizar un análisis para asegurar que el efecto de la temperatura tenía incidencia nula en la eficiencia de extracción. Esto porque, si bien el diseño experimental estableció que la temperatura no es una variable estadísticamente significativa, existen antecedentes que permitían predecir mejores recuperaciones a temperaturas más altas, donde se establece que el uso de disolvente a temperaturas y presiones elevadas promueven la desorción de compuestos orgánicos desde matrices sólidas. Generalmente, las altas temperaturas permiten interrumpir las

fuertes interacciones establecidas entre el analito y la matriz, disminuyen la viscosidad del disolvente, favoreciendo su penetración en las partículas de la matriz, y con esto aumentado la eficiencia de la extracción (Richter B., 1996). Para resolver esta problemática se plantearon dos sets de experimentos, de tres ensayos cada uno, en ambos casos el tiempo estático se consideró en el nivel mínimo (0 minutos) y el tiempo dinámico en 30 minutos (esperando que mientras más tiempo la muestra estuviera en contacto con la mezcla de disolvente, una mayor fracción de analitos sería extraída). En tanto, la temperatura se varió, el primer conjunto de experimentos se realizó a 50°C y el segundo grupo a 200°C. En la Tabla 10 se resumen los valores que resultaron de esta evaluación.

Tabla 10: Estudio del efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción.

Temperatura (°C)	Experimento	Relación de áreas	Promedio	SD	CV (%)
50	1	1,63	1,67	0,04	2,5
	2	1,70			
	3	1,71			
200	1	1,57	1,61	0,04	2,7
	2	1,61			
	3	1,62			

Este estudio permitió aseverar que la temperatura no ejerce ningún efecto que contribuya a incrementar la eficiencia de extracción, al contrario se evidenció una respuesta menor a 200°C, en relación a la respuesta que se obtuvo para los ensayos realizados a 50°C. Esto se puede atribuir a que a mayores temperaturas, se produce co- extracción de otras sustancias orgánicas presentes en la matriz (Yirgaalem A., 2000) que sólo dificultan el proceso de limpieza para obtener los analitos que interesan, pues de los ensayos

realizados a 200°C se obtuvieron extractos más coloreados y menos transparentes. Además, el coeficiente de variación resultó ser mejor para las experiencias que se realizaron a 50°C lo que predice una buena repetibilidad en estas condiciones de extracción. Estos resultados ratificaron el estudio que estableció las variables estadísticamente significativas y permitieron descartar cualquier efecto de la temperatura que contribuyera a mejorar la eficiencia de extracción.

5.2 Optimización

La etapa de optimización se realizó mediante un estudio univariado. Tanto el tiempo estático como la temperatura se ajustaron en sus niveles mínimos (0 min y 50°C) y se dejaron constantes, ya que no tienen relevancia sobre la eficiencia de extracción. El tiempo dinámico de extracción que es la variable a optimizar, se varió desde 10 (min) hasta 60 (min) en siete ensayos diferentes.

Tabla 11: Respuesta expresada mediante la relación de áreas (A suma PCBs/ A EI) a distintos tiempos dinámicos de extracción.

Nº Experimento	Tiempo de Extracción (min)	Área - suma de PCBs	Área EI	Respuesta (A analito/A EI)
1	10	20571957	77630028	0,27
2	15	51058341	72526052	0,70
3	20	93718792	67912168	1,38
4	25	116366640	69183496	1,68
5	30	123787775	72602800	1,71
6	40	129915111	76736628	1,69
7	60	114114309	68006144	1,68

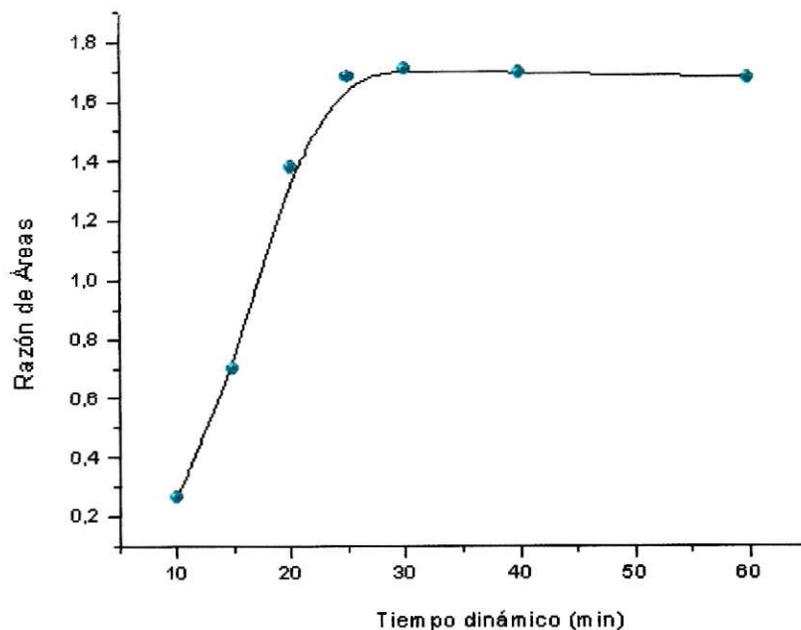


Figura 16: Efecto del tiempo dinámico de extracción sobre la respuesta.

Como se observa en la Tabla 11 y en la Figura 16, la respuesta representada por la relación de áreas entre el analito (sumatoria de PCBs) y el estándar interno, aumenta a medida que el tiempo dinámico de extracción se incrementa, este comportamiento se mantiene hasta los 30 minutos, este punto marcó el valor máximo para la respuesta. Así, la tendencia de la gráfica indica que aunque el proceso de extracción se extienda más allá de los 30 minutos, la eficiencia de extracción es la misma, encontrándose así el valor de tiempo dinámico óptimo para obtener la máxima eficiencia de extracción.

Basado en estos resultados, las condiciones óptimas del método de extracción PSE para lixiviar desde una matriz de biosólido enriquecido con PCBs son: 50 °C de temperatura, 0 minutos de tiempo estático y 30 minutos de tiempo dinámico.

5.3 Validación del método PSE en términos de precisión y exactitud

Para validar el método de extracción PSE optimizado se realizó una curva de calibración (Figura 17) a partir de estándares de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Aroclor 1254 y 1260 ($n=6$) en un rango de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $30 \mu\text{g mL}^{-1}$.

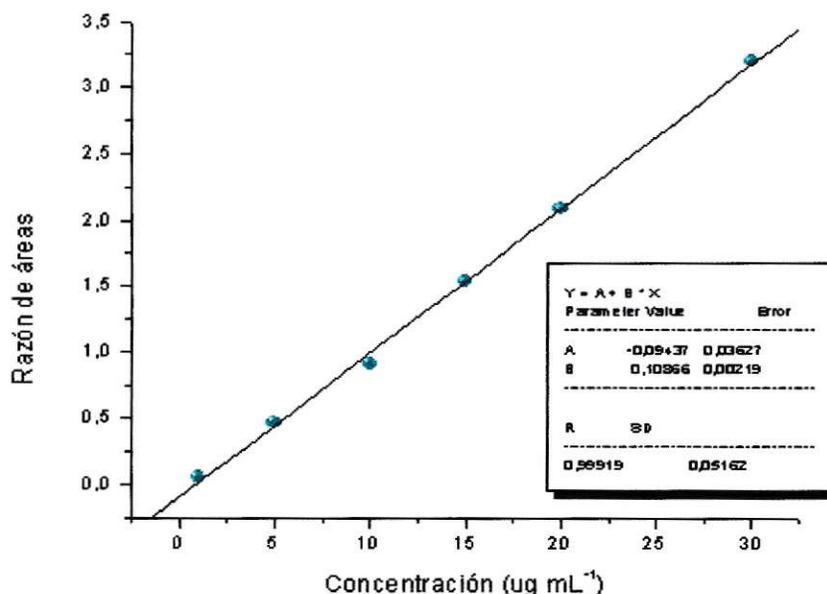


Figura 17: Curva de calibración de PCBs (rango 1 – 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

El coeficiente de regresión obtenido fue 0,9992; lo que permitió una determinación cuantitativa de las distintas muestras analizadas.

El nivel de precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad, de esta manera se verificó el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para un set de seis experiencias (Tabla 12). La exactitud se midió en términos de la recuperación,

considerando que para estos estudios se usó una muestra de biosólido enriquecido con una concentración de 50 mg kg^{-1} de estándares de PCBs.

Tabla 12: Precisión y exactitud del método PSE.

Nº Exp	Σ Área PCBs	Área EI	Razón de áreas	C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C (mg kg^{-1})
1	34661667	19658020	1,69	16,45	36,19
2	32390417	18190684	1,68	16,34	35,95
3	33753021	20757650	1,76	17,02	37,44
4	40748315	23206760	1,66	16,09	35,40
5	29123298	16023805	1,68	16,30	35,86
6	34701502	19578858	1,64	15,98	35,16
Promedio respuesta	Prom C ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Prom C (mg kg^{-1})	Desv Estándar	CV (%)	% R
1,69	16,38	36,04	0,04	2,3	72,01

En términos de precisión, el coeficiente de variación obtenido (2,3 %) da cuenta de una buena repetibilidad del método desarrollado, esto es, se registró alta concordancia entre los resultados individuales obtenidos al aplicar el método, seis veces a una muestra diferente en las mismas condiciones. En cuanto a la exactitud del método, el porcentaje de recuperación resultó ser menor al esperado, estudios precedentes (Mangas E. y col, 1997) han reportado niveles de recuperación de un 89% para la extracción de PCBs desde biosólidos mediante extracción Soxhlet, seguido del procedimiento de limpieza utilizado en este estudio (Method 3630C, USEPA). Por lo tanto, quedó en evidencia que cerca de un 30% de los analitos de interés quedaron ligados a la matriz, sobre todo aquellos con mayor masa molar.

Para lograr debilitar las fuertes interacciones establecidas entre los PCBs y la matriz se aplicó energía adicional al sistema, asistiendo el proceso de extracción con ultrasonido.

5.4 Efecto del tiempo de ultrasonido en la extracción PSE - US

Para evaluar el efecto que tiene el ultrasonido sobre la eficiencia de extracción de PCBs, se realizó un set de cuatro ensayos variando desde 0 hasta 30 minutos el tiempo en que se asistió con ultrasonido la extracción antes optimizada. Tal como se indicó en la sección 4.5 el horno de aluminio se reemplazó por un baño de ultrasonido regulado a 50°C, el tiempo estático se ajustó en 0 minutos y en 30 minutos el tiempo dinámico (condiciones óptimas establecidas en este estudio para el método PSE).

Tabla 13: Efecto del tiempo de ultrasonido (US) en la extracción de PCBs.

Tiempo de US (min)	Relación de áreas	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración (mg kg^{-1})	% Recuperación
0	1,83	16,87	37,10	74,21
5	2,05	18,79	41,34	82,69
15	2,43	22,12	48,67	97,34
30	2,59	23,52	51,76	103,51

Los resultados que se muestran en la Tabla 13 dan cuenta de un efecto positivo en términos de asistir con ultrasonido el proceso de extracción, se puede observar que mientras mayor es el tiempo de ultrasonido, el porcentaje de recuperación se incrementa alcanzando un valor que bordea incluso el 100% a los 30 minutos, lográndose con este estímulo adicional desorber a los analitos ligados a la matriz. El ultrasonido se ha utilizado ampliamente para la extracción de PCBs desde muestras ambientales sólidas, se ha demostrado que la energía aportada por el ultrasonido promueve mayormente el

lavado del suelo, permitiendo la lixiviación de los analitos que se encuentran más enlazados a las partículas sólidas de la matriz (Sporring S. y col, 2005). Un buen ejemplo de los efectos que tiene la aplicación de ultrasonido es un estudio donde se comprueba la desorción de tetraclorobifenilo ligado a una matriz de sedimento (Lu Y., Weavers L., 2002).

En definitiva, las condiciones óptimas del método PSE – US para obtener recuperaciones cuantitativas de PCBs desde biosólidos son las siguientes: 50°C de temperatura, 0 minutos de tiempo estático, 30 minutos de tiempo dinámico y de ultrasonido.

5.5 Validación del método PSE – US mediante parámetros analíticos

5.5.1 Obtención de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Con el objetivo de establecer parámetros de calidad analítica como el límite de detección y límite de cuantificación se construyeron 4 curvas de calibración ($n = 5$), estas curvas se realizaron para cada una de las familias de PCBs consideradas en el estudio. El rango de concentración fue de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ considerando la concentración total de PCBs presente en los estándares. Sin embargo, las mezclas de estándares (Aroclor 1254 y 1260) contienen diferentes porcentajes de los distintos homólogos de PCBs. La Tabla 14 muestra el porcentaje de homólogos de PCBs presente en las mezclas de Aroclor.

Tabla 14: Porcentaje de homólogos de PCBs presente en las mezclas de Aroclor.

N° átomos de Cloro	Grado de Aroclor	
	1254	1260
1	-	-
2	0,5	-
3	1	-
4	21	-
5	48	12
6	23	38
7	6	41
8	-	8
9	-	1
10	-	-

A partir de estos valores se realizó el cálculo de concentración de cada homólogo a partir de la concentración total de PCBs (Tabla15). Luego, las Figuras 18, 19, 20 y 21 muestran las curvas de calibración obtenidas para bifenilos tetra, penta, hexa y heptaclorados.

Tabla 15: Concentración de homólogos de PCBs para la construcción de las curvas de calibración.

Homólogo de PCB	% en la mezcla de estándares	Concentración total PCBs ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
		0,1	0,5	0,8	1	3
Concentración Homólogo ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
tetraclorobifenilo	10,5	0,01	0,05	0,08	0,10	0,32
pentaclorobifenilo	30	0,03	0,15	0,24	0,30	0,90
hexaclorobifenilo	30,5	0,03	0,15	0,24	0,31	0,92
heptaclorobifenilo	23,5	0,02	0,12	0,19	0,24	0,71

* Al sumar los porcentajes de homólogos se obtiene 94,5, el 100% se completa considerando a los bifenilos di, octa y nona clorados, que están presentes también en las mezclas de Aroclor, pero no se consideraron en el estudio por estar en muy baja concentración.

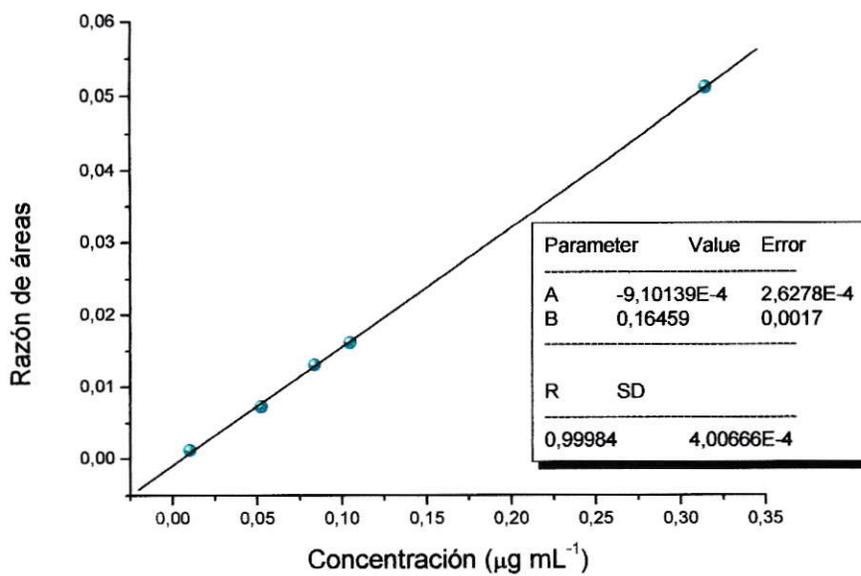


Figura 18: Curva de calibración para bifenilos tetraclorados.

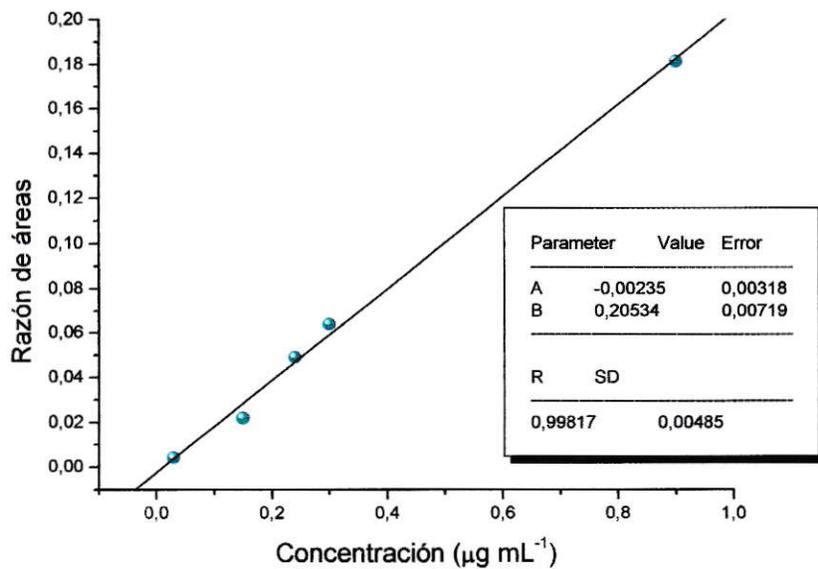


Figura 19: Curva de calibración para bifenilos pentaclorados.

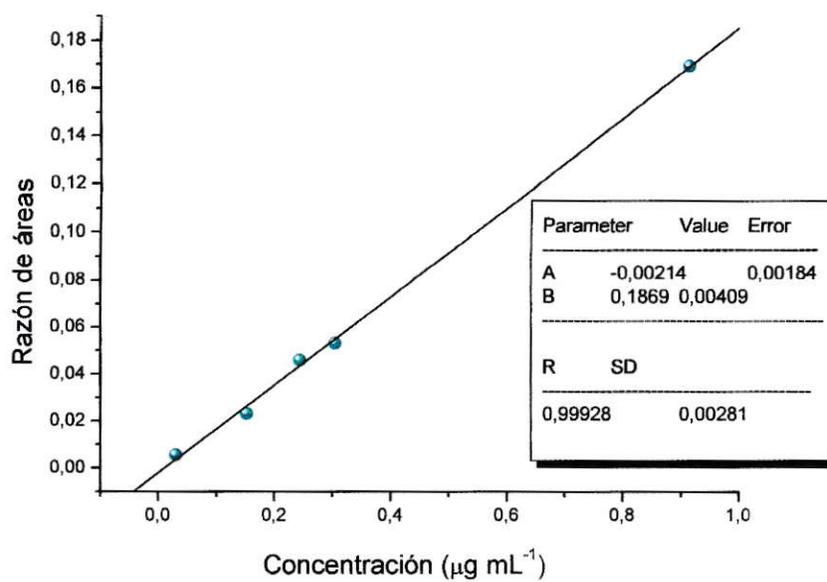


Figura 20: Curva de calibración para bifenilos hexaclorados.

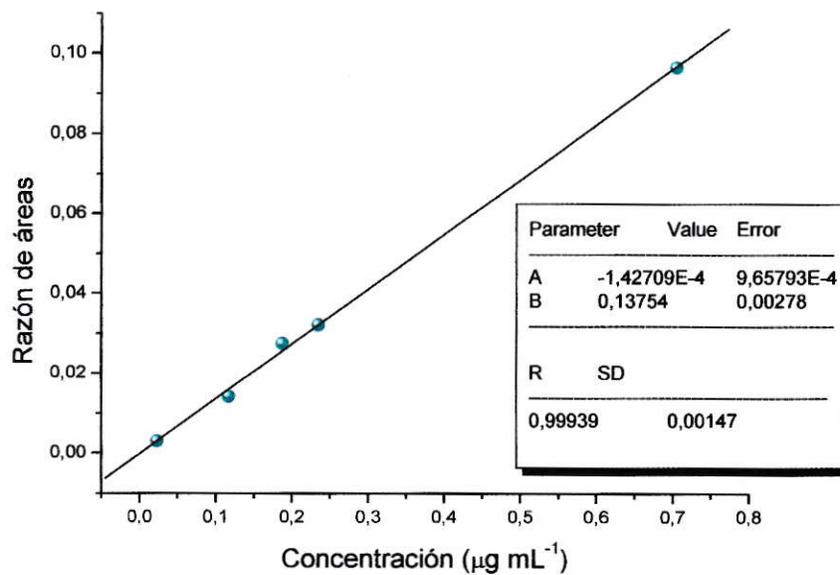


Figura 21: Curva de calibración para bifenilos heptaclorados.

En la Tabla 16 se resumen los resultados obtenidos para el cálculo del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de los distintos homólogos de PCBs. El cálculo del límite de detección se realizó empleando el criterio de 3 veces la desviación estándar del blanco (intercepto en la curva de calibración). A su vez, el límite de cuantificación se calculó considerando 10 veces la desviación estándar del blanco.

Tabla 16: Límites de detección y de cuantificación para los distintos homólogos de PCBs.

Homólogo de PCB	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)
Bifenilos tetraclorados	0,01	0,04
Bifenilos pentaclorados	0,10	0,34
Bifenilos hexaclorados	0,07	0,22
Bifenilos heptaclorados	0,05	0,16

Es necesario especificar que el análisis de PCBs para el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación es distinto al que se usó para la optimización del método de extracción de PCBs. En lugar de tomar sólo tres picos representativos de cada una de las familias de PCBs, se hizo un análisis exhaustivo de todas las señales cromatográficas, mediante la relación m/z de los iones característicos de cada familia isomérica. De esta manera, la respuesta se expresó como la sumatoria de las áreas cromatográficas para los distintos homólogos de PCBs.

5.5.2 Estudio de repetibilidad para el método de extracción PSE –US

El análisis de repetibilidad (n = 6) para el método PSE – US se realizó con una muestra de biosólido sin estándares de PCBs, para esto primero se constató que la muestra tuviese un contenido cuantitativo de PCBs. La metodología que se utilizó para la

cuantificación se describe en la sección 5.7 donde se muestra el análisis que se usó para la aplicación del método sobre muestras reales.

Tabla 17: Resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad del método PSE – US.

Nº Experimento	Área analito	Área estándar Interno	Relación de áreas
1	41138	17595502	0,0023
2	47787	19122563	0,0025
3	44248	18788963	0,0024
4	41969	18145215	0,0023
5	43082	17958263	0,0024
6	37892	16878615	0,0023
Promedio relación de áreas			CV (%)
2,36E-3			8,56E-5
			3,6

El coeficiente de variación obtenido mediante el estudio de repetibilidad (Tabla 17), si bien es más alto que el obtenido para la validación del método PSE, se mantiene dentro de los márgenes de calidad analítica que permiten confirmar que se ha desarrollado una metodología eficiente para la determinación de PCBs desde una matriz de biosólidos.

5.6 Comparación de la eficiencia de extracción de las metodologías desarrolladas PSE y PSE – US con la metodología de extracción tradicional Soxhlet

Las Figuras 22 y 23 muestran los cromatogramas obtenidos para las extracciones del material de referencia (0,5 gramos) mediante la metodología PSE y la metodología PSE – US, ambas en condiciones optimizadas. Luego, la Figura 24 presenta un cromatograma obtenido para una extracción mediante el sistema convencional Soxhlet, cuyo procedimiento se llevó a cabo con 3 g de material de referencia y 300 mL de disolvente. Se debe especificar que durante la etapa de limpieza del extracto se hizo una variación,

en lugar de pasar por la columna de sílica gel los 2 mL, volumen al cual se concentró el extracto, se tomó sólo la sexta parte de ese volumen, considerando que las extracciones con la metodología desarrollada en este estudio se llevaron a cabo con una sexta parte de la cantidad de muestra usada para la extracción Soxhlet.

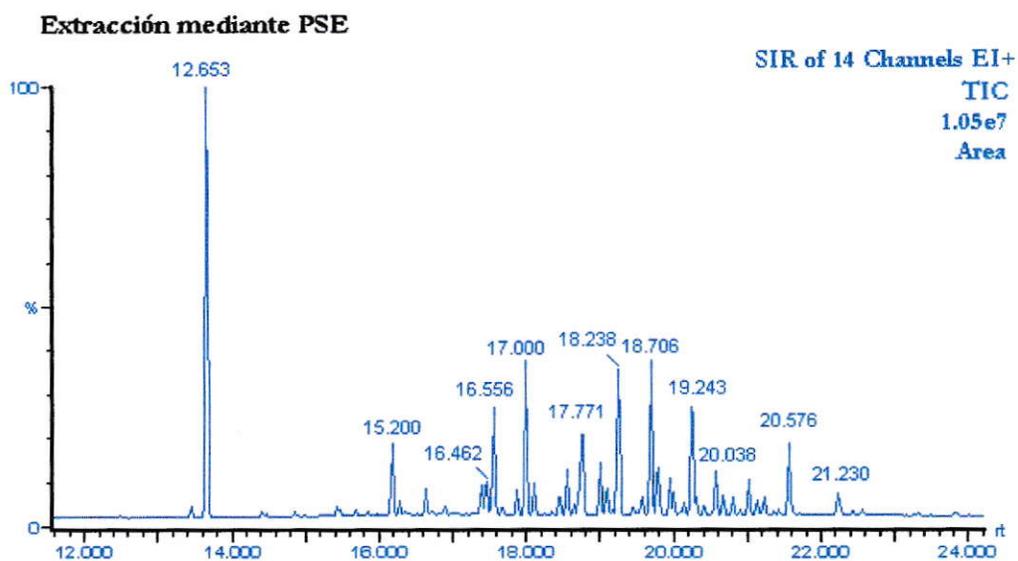


Figura 22: Cromatograma de un extracto obtenido mediante la metodología PSE en condiciones optimizadas.

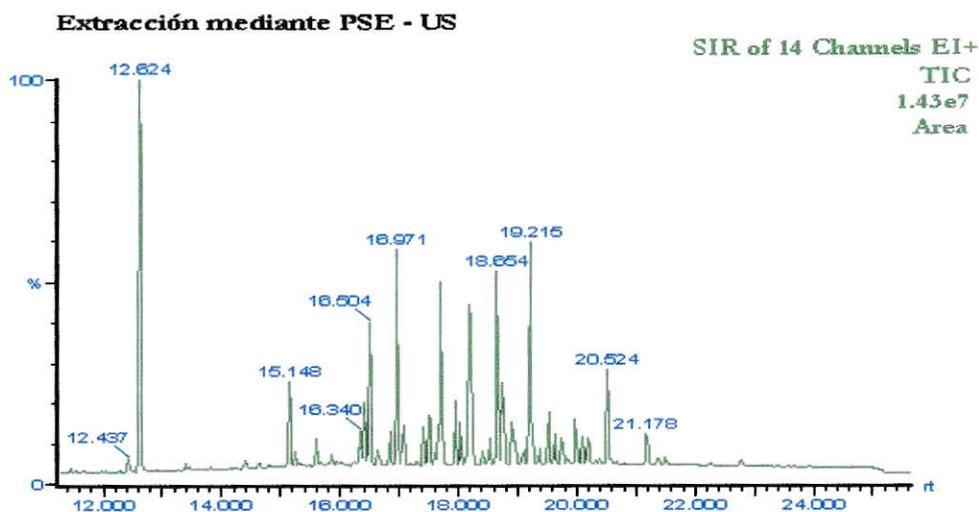


Figura 23: Cromatograma de un extracto obtenido mediante la metodología PSE - US en condiciones optimizadas.

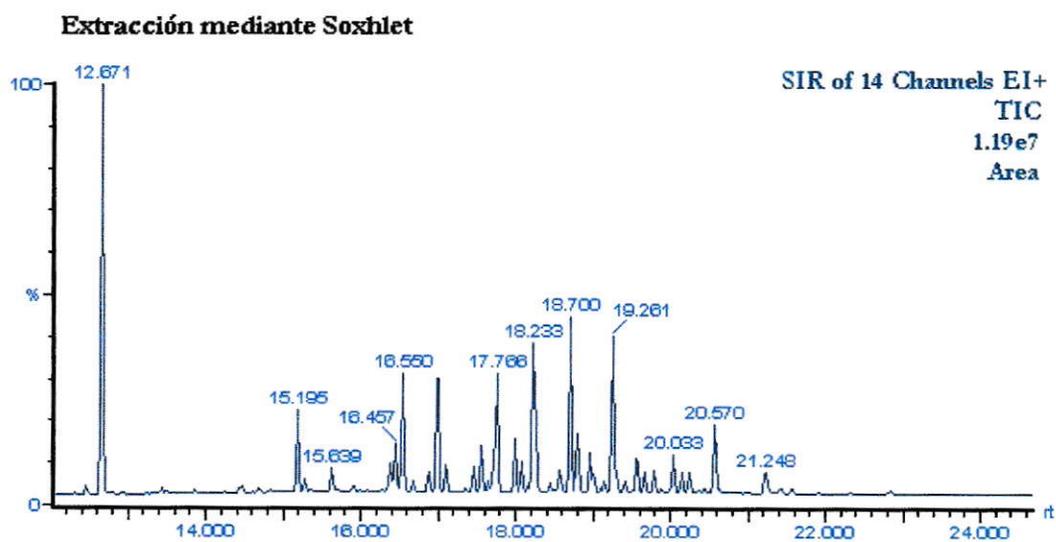


Figura 24: Cromatograma de un extracto obtenido mediante metodología convencional Soxhlet.

Tabla 18: Comparación de la eficiencia de extracción de las distintas metodologías de extracción.

Metodología de Extracción	Promedio señal	% Recuperación
PSE	1,68	72,0
PSE – US	2,59	103,5
Soxhlet	2,19	87,9

En la Tabla 18 se observa que la recuperación obtenida con la técnica tradicional Soxhlet bordea el 90%, este valor es similar al obtenido en la determinación de congéneres de PCBs mediante extracción Soxhlet desde una matriz sólida (Sporring S. y col, 2005). El buen nivel de recuperación obtenido respalda y explica porque se reconoce a ésta como metodología estándar y principal referencia para evaluar el rendimiento de otras técnicas de extracción desarrolladas. Sin embargo, fue posible constatar el alto consumo de disolvente y tiempo, lo que incidió inmediatamente en un mayor costo para llevar a cabo el proceso de extracción.

Con respecto a la metodología PSE, se reportó un nivel de recuperación de un 72%, valor más bajo en comparación al obtenido con la técnica tradicional, sin embargo, se reconocieron ventajas de esta técnica por sobre la metodología convencional Soxhlet. En principio, se redujo de manera importante el tiempo de extracción, bajando desde 24 horas a 30 minutos. El consumo de disolvente se redujo también considerablemente, desde 300 mL a 30 mL, lo que permitió minimizar los costos y evitar una exposición excesiva a la inhalación de gases tóxicos. Por otro lado, la inversión en energía también bajó con esta técnica, las extracciones se realizaron a 50°C y no a 150°C como en el caso

de la extracción Soxhlet. Esta reducción en temperatura permitió obtener extractos de mejor calidad, lo que se midió observando el color de éstos, en el caso de los extractos obtenidos mediante la técnica Soxhlet se observó un tono muy oscuro y poco transparente, situación que dificultó el procedimiento de limpieza, ya que aún cuando se tomaron los resguardos necesarios, fue imposible obtener los extractos absolutamente limpios. La repetibilidad del método es muy buena, tal como se observa en la Tabla 12 el coeficiente de variación obtenido es bastante bajo (2,3%) y si bien los analitos no se extraen de manera cuantitativa, mediante el desarrollo de este método se obtuvieron las bases para desarrollar una metodología PSE asistida por ultrasonido.

La metodología PSE – US rescata las principales ventajas de las dos técnicas mencionadas anteriormente. Al igual que en la técnica PSE se produjo una reducción importante del tiempo de extracción, uso de disolvente y temperatura, en comparación con el método estándar. Según se muestra en la Tabla 18, mediante esta metodología se reportaron los mejores niveles de recuperación, además de una buena precisión, donde el valor para el coeficiente de variación de este método es un 3,6% (Tabla 17). Estos resultados permitieron constatar que el uso de ultrasonido tiene repercusiones importantes en la cinética del proceso, aportando la energía adecuada para lograr la desorción de los analitos desde la matriz, así como se ha evidenciado en estudios previos (Sporring S. y col, 2005), donde se informaron recuperaciones de los distintos congéneres de PCBs en un rango de 100 – 115%.

5.7 Aplicación del método PSE – US a muestras reales

En las condiciones óptimas se aplicó el método PSE - US a muestras reales. Se hizo un análisis riguroso de todas las señales presentes en los cromatogramas, para verificar que las señales hayan sido generadas por los analitos de interés y no por interferentes. El análisis se llevó a cabo empleando el criterio de la diferencia ($\leq 30\%$) entre la razón de áreas de los iones m/z de cuantificación y m/z de confirmación para el estándar; y la razón de las áreas de los iones m/z de cuantificación y m/z de confirmación para la muestra. A continuación se detalla el análisis para la muestra de biosólido proveniente de la Planta El Trebal del año 2004.

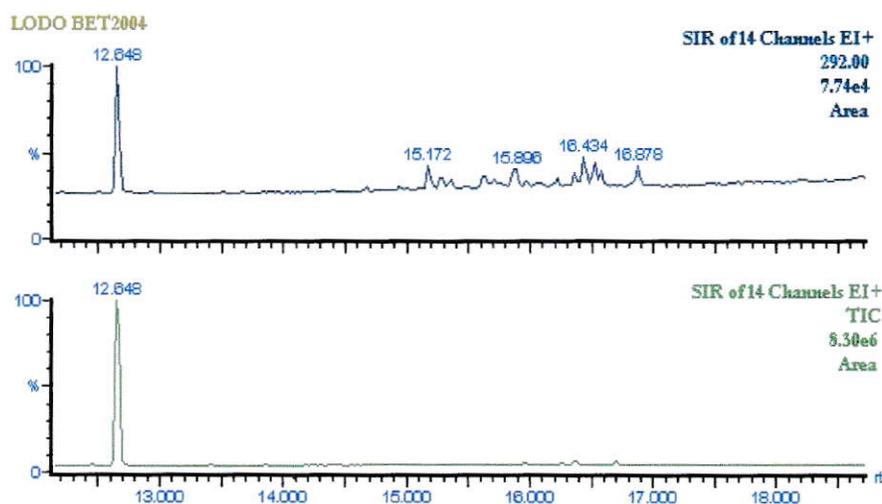


Figura 25: Cromatograma de un extracto de biosólido año 2004.

Al observar el cromatograma inferior de la Figura 25, los analitos se encontraron a concentraciones muy bajas, esto se pudo evitar utilizando una menor concentración de estándar interno, cuestión que se consideró para los análisis posteriores. De todas

maneras, cuando se analizó el cromatograma superior m/z 292 se registraron señales en los tiempos de retención característicos para este tipo de ion correspondiente a los tetraclorobifenilos. A continuación, se detalla el estudio aplicado para la cuantificación de PCBs en muestras reales.

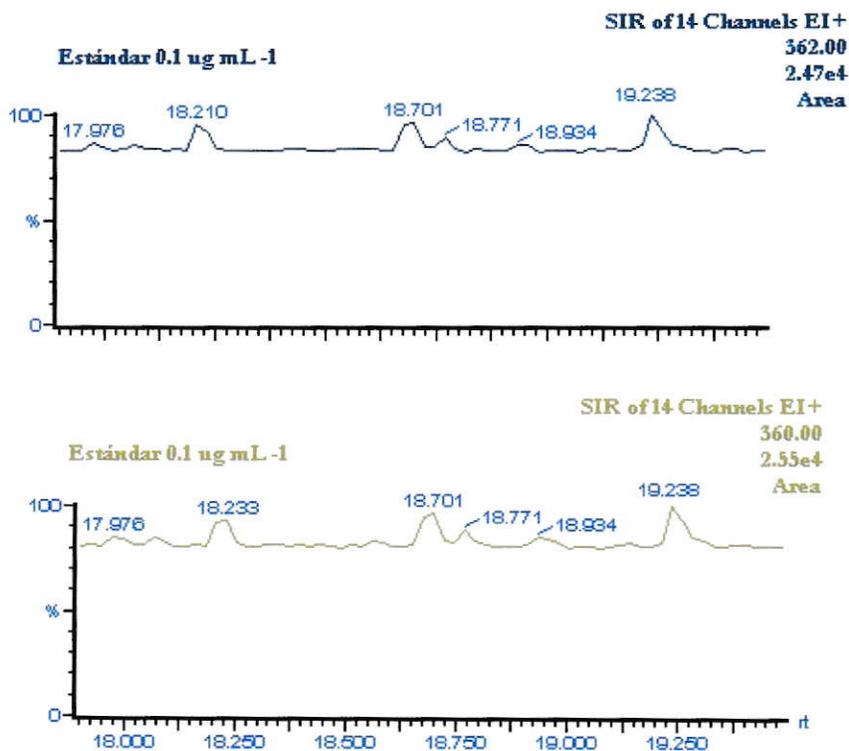


Figura 26: Picos para los iones m/z 362 y 360 del estándar a una concentración de 0,1 µg mL⁻¹

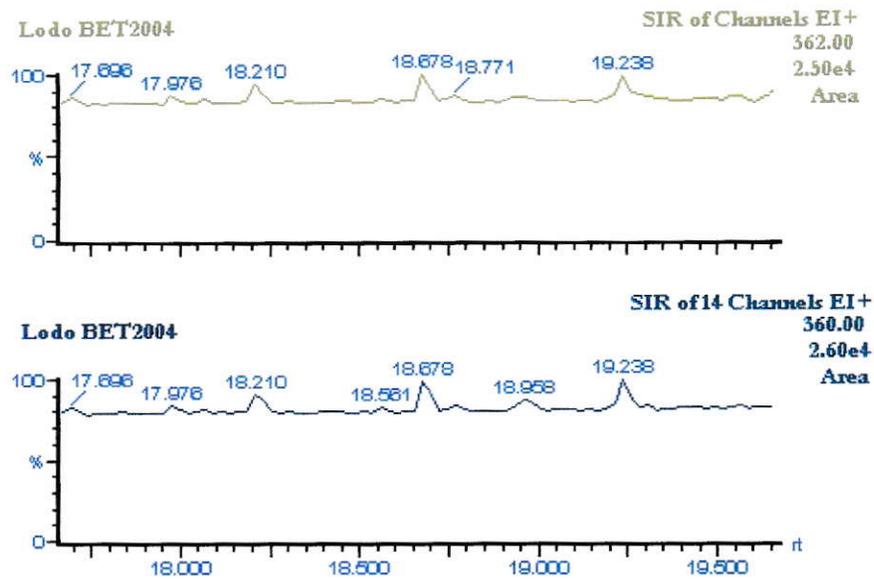


Figura 27: Picos para los iones m/z 362 y 360 de la muestra de biosólido año 2004.

En las Figuras 26 y 27 se observan picos muy similares tanto en área como en tiempos de retención para el estándar y la muestra analizada. Las Figuras 28 y 29, muestran las áreas de los picos cromatográficos integradas para los iones m/z 362 y 360 tanto de la muestra como del estándar.

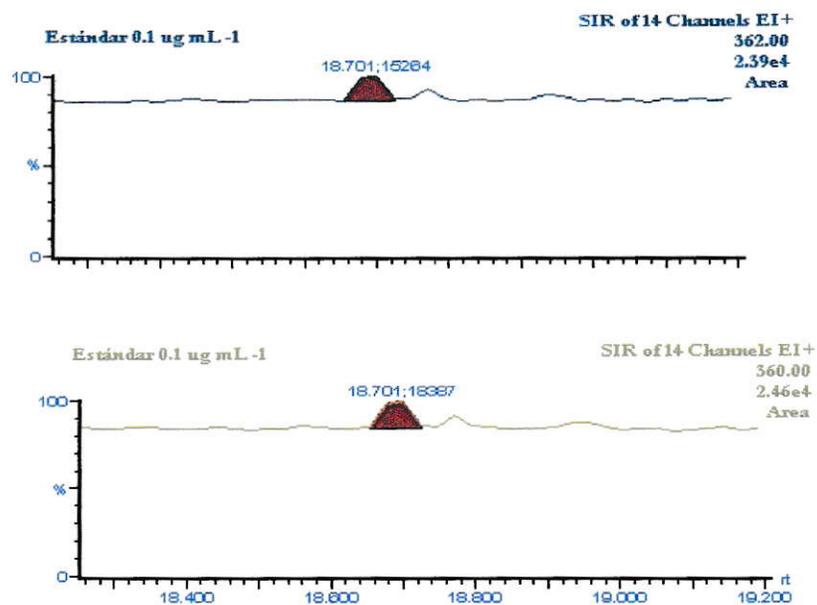


Figura 28: Áreas de los picos cromatográficos integradas para los iones m/z 362 y 360 del estándar a $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

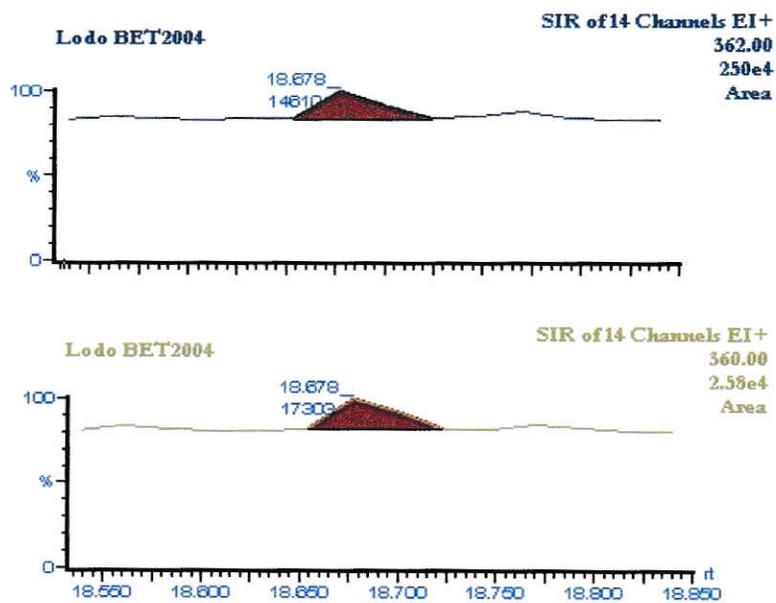


Figura 29: Áreas de los picos cromatográficos integradas para los iones m/z 362 y 360 de la muestra de biosólido año 2004.

Si se realiza una razón entre las áreas mostradas en la Figura 28 para el estándar, se tiene un valor de 1,20. Luego, la razón de las áreas que se muestran en la Figura 29 para la muestra de biosólido arroja un valor de 1,18. La diferencia entre estos dos valores es de 1,67%, por lo tanto, se asumió que esta señal corresponde a hexaclorobifenilo cuyos iones 360 y 362 son característicos para estos compuestos.

Sin embargo, cuando se calculó la concentración total de hexaclorobifenilo en la muestra de biosólido (considerando todas las señales registradas para estos iones) mediante la curva de calibración construida para esta familia de homólogos de PCBs (Figura 20), se obtuvo un valor de $0,074 \text{ mg kg}^{-1}$, valor que está sobre el límite de detección ($0,065 \text{ mg kg}^{-1}$), pero al mismo tiempo se encuentra bajo el límite de cuantificación que es de $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$. De acuerdo a este análisis, se estableció que la muestra no presenta este tipo de analito, o por lo menos no en el rango de concentraciones en que es capaz de cuantificar el método.

De esta manera, se realizó un análisis que permitiera establecer la presencia de los distintos homólogos de PCBs en cuatro muestras de biosólidos provenientes desde la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de El Trebal obtenidas en cuatro épocas distintas utilizando el método PSE – US optimizado. Los resultados para el estudio se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Contenido de homólogos de PCBs en muestras de biosólido.

Muestra	C (mg kg ⁻¹) * tetra	C (mg kg ⁻¹) penta	C (mg kg ⁻¹) hexa	C (mg kg ⁻¹) hepta	C (mg kg ⁻¹) Total
Lodo BET2004	0,32	ND	NC	ND	0,32
Lodo BET2005	-	-	-	NC	-
Lodo BET2006	-	-	ND	0,20	0,20
Lodo BET2007	-	-	ND	-	-

* ND: Concentración bajo nivel de detección; NC: Concentración sobre el nivel de detección y bajo el nivel de cuantificación; cuadros con guión indican que no hubo registro de señal.

** Los prefijos indican el grado de cloración de los distintos homólogos de PCBs.

Mediante la metodología PSE – US desarrollada se pudo evidenciar la presencia de tetraclorobifenilos en la muestra de biosólido del año 2004 a una concentración de 0,32 mg kg⁻¹ y de heptaclorobifenilos en la muestra de biosólido del año 2006 a una concentración de 0,20 mg kg⁻¹. En 1990 la USEPA elaboró un estudio donde se determinaron compuestos orgánicos presentes en biosólidos provenientes de 209 Plantas de Tratamiento de Aguas de Estados Unidos, donde se encontró en 13 de ellas la presencia de Aroclor 1254 a una concentración de 1,77 mg kg⁻¹ (Epstein E., 2003). Estudios similares para la determinación de este tipo de compuestos en muestras de biosólido provenientes desde una Planta de Tratamiento de Aguas de Río de Janeiro han revelado la presencia de los cuatro homólogos estudiados, en un rango de concentración de 22,9 a 45,7 mg kg⁻¹, además de otros homólogos y congéneres de PCBs (Souza M., Kuch B.,2005).

Al comparar los resultados mediante este estudio con los resultados obtenidos por los estudios recientemente citados, los niveles de concentración de PCBs encontrados son más bajos, sin embargo, se debe mencionar que los valores de concentración obtenidos para los distintos homólogos de PCBs mediante la aplicación del método PSE – US no reflejan la concentración total de PCBs presentes en las muestras de biosólidos, ya que no se cuantificaron todos los posibles congéneres de PCBs con este análisis. Esta situación permitió inferir que la concentración total real de PCBs en las muestras de biosólido podría ser mayor al que este estudio ha revelado.

Por otro lado, la concentración de $0,32 \text{ mg kg}^{-1}$ que se registró en la muestra de biosólido del año 2004 (muestra que se enriqueció con estándares de PCBs) corresponde sólo a un 0,6% de la cantidad total de PCBs con la que se enriqueció el biosólido utilizado como material de referencia (50 mg kg^{-1}), este hecho permitió aseverar que no se produjo una sobreestimación de los compuestos en el análisis producto de un efecto matriz, vale decir, que la muestra de biosólido sobre la cual se dispusieron los estándares de PCBs no estaba provista de los homólogos de PCBs considerados para el estudio.

VI. CONCLUSIONES

- ▶ Se logró el desarrollo de dos metodologías alternativas para la extracción de PCBs desde biosólidos, basadas en el uso de disolventes presurizados en continuo (PSE y PSE - US).
- ▶ Primero, se logró desarrollar un método de extracción PSE. Con este método no se obtuvo una recuperación satisfactoria (72%), en comparación con la recuperación obtenida mediante la metodología tradicional Soxhlet (88%), sin embargo, el método demostró ser cuantitativo en términos de precisión (2,3% CV). Las principales ventajas del método PSE frente a la técnica estandarizada para la extracción de contaminantes orgánicos desde una matriz sólida Soxhlet son la disminución en el uso de disolvente y de tiempo. El tiempo de extracción se logró reducir desde 24 horas a 30 minutos, mientras que el consumo de disolvente bajó de 300 mL a 30mL.
- ▶ Luego se desarrolló un método de extracción asistido con ultrasonido PSE – US, estableciéndose las condiciones óptimas para extraer eficientemente a los analitos desde la matriz de biosólido. El método además de ser ventajoso frente al método convencional Soxhlet en términos de la reducción del uso de disolvente y tiempo; proporciona información con altos niveles de calidad analítica (precisión y exactitud).

- ▶ La mayor eficiencia de extracción se obtuvo con la extracción PSE – US, aumentando la recuperación de un 72% (recuperación obtenida mediante sistema PSE) a un 103%.
- ▶ El diseño experimental es una herramienta óptima para estudiar simultáneamente el efecto de las variables consideradas en el estudio sobre la respuesta y sus posibles interacciones. Por otro lado, permite disminuir el tiempo en el desarrollo del procedimiento experimental, lo que se traduce en un ahorro de recursos.
- ▶ Se logró el desarrollo de un método cuantitativo para informar acerca de la presencia de los diferentes homólogos de PCBs por separado y así no expresar el contenido de PCBs únicamente como la sumatoria de los PCBs considerados en el estudio.
- ▶ Se logró evidenciar algunos de los analitos considerados en el estudio, luego de aplicar el método PSE – US a muestras de biosólido provenientes desde una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales. Se registró tetraclorobifenilos en la muestra de biosólido del año 2004 a una concentración de $0,32 \text{ mg kg}^{-1}$ y de heptaclorobifenilos en la muestra de biosólido del año 2006 a una concentración de $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$.
- ▶ Finalmente, el hecho de haber reportado la presencia de PCBs en algunos de los biosólidos analizados sirve como alerta para instar a los entes regulatorios del país sobre la necesidad de desarrollar estudios que permitan incluir este tipo de contaminantes orgánicos en un marco normativo sobre el uso de los biosólidos en el campo agrícola, siendo esta la tendencia mundial, pues no se debe perder de vista la capacidad de estos compuestos de bioacumularse.

VII. REFERENCIAS

- ▶ Abramowicz D.A., (1990). Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review, *Critical Rev. Biotechnol*, 10(3), 241 – 251.
- ▶ Ahlborg y col., (1992). Polychlorinated Naphthalenes and Other Organochlorine Contaminants in Swedish Human Milk.
- ▶ Artiola, J.F., (1996). Waste Disposal. Chapter 10. In: *Pollution Science*. Eds. Pepper, Gerba and Brusseau. Academic Press, NY.
- ▶ ATSDR (1996). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls, in: Draft for public comment (update), US Department of Health & Human Services. Washington, DC.
- ▶ ATSDR (2000). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls, in : Draft for public comment (update), US Department of Health & Human Services. Washington, DC.
- ▶ Baird C., (2001). *Química Ambiental*. Ed . Reverté S.A., 346-366.
- ▶ Bitton G., (1999). *Wastewater Microbiology*. 2ª Edición Wiley-Liss, New York.
- ▶ Casas J.M., García J., Guadayol J.M., Olivé, J., (1994). *Análisis Instrumental 2: Cromatografía*. Edicions UPC, Barcelona, 250.
- ▶ Clair N., Sawyer T., Perry L., McCarty, Gene F., Parkin, (2001). *Química para Ingeniería Ambiental*, Editorial Mc – Graw – Hill, Interamericana, S.A., Colombia.
- ▶ Clapp C.E., Larson W.E. y Dowdy R.H., (1994). *Sewage sludge: Land utilization and the environment*. SSSA Miscellaneous Publication Amer. Soc. of Agron., Inc., Madison.
- ▶ CONAMA (2005). *Reglamento para el Manejo de lodos no peligrosos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas*. República de Chile.
- ▶ Epstein E., (2003). *Land Application of Sewage Sludge and Biosolids*. Lewis Publishers. CRC Press LLC, USA.
- ▶ Goldstein J.A., Safe S., (1989). Mechanism of action and structure-activity relationships for the chlorinated dibenzo-p-dioxins and Halogenated Biphenyls.
- ▶ Harukuni U., Masakazu A., (1985). Past and current dermatological status of Yuso patients, *Environmental Health Perspectives*, 59 (11), 11 – 15.

- ▶ Hawthorne S., Yang Y., Miller D., (1994). Extraction of Organic Pollutants from Environmental Solids with Sub – and Supercritical Water. *Analytical Chemistry*, 66, 2912 -2920.
- ▶ Hutzinger O., Safe S., Y Zitko V., (1974). *The chemistry of PCBs*, CRC Press Inc., USA.
- ▶ Lu Y., Weavers L., (2002). Sonochemical Desorption and Destruction of 4-Chlorobiphenyl from Synthetic Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 232.
- ▶ Mangas E., Vaquero M., Comellas L., Broto-Puig F., (1997). Analysis and fate of aliphatic hydrocarbons, linear alkylbenzenf, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sloe-amended soils. *Chemosphere*, Vol. 36, No. 1, pp. 61-72.
- ▶ Massart D.L., Vandeginste B., Buydens L., De Jong S., Lewi P., Smeyers-Verbeke P., (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam.
- ▶ McBride M. B., (1994). Trace and toxic elements in soils. In: *Environmental chemistry of soils*. 1ª Edición. Oxford University Press. New York.
- ▶ Morales J., (2003). Lixiviación de elementos inorgánicos desde material particulado atmosférico utilizando agua subcrítica acidulada en régimen continuo. T, 10 – 16 y 25 -27.
- ▶ NATO/CCMS (1988).PCDFs calculated using International TEFs according.
- ▶ OMS (1993). Polychlorinated biphenyls and therphenyls, en *Environmental Health Criteria 140*, 2da Edición, World Health Organization, Geneva.
- ▶ Perry R., Green D., Maloney J., (1997). *Perry's Chemical Engineer's Handbook*. Editorial Mc – Graw – Hill, New York.
- ▶ Pimental G., (1960). *The Hydrogen Bond*. Editorial W. H. Freman and company.
- ▶ Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, PNUMA, (1999). Ginebra.
- ▶ Quensen III J.F., Boyd S.A., Tiedje J.M. (1990). Dechlorination of four comercial polychlorinated byfenils mixture (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments, *Appl Environ Microbiol* 56(8), 2360 – 2369.
- ▶ Richter B., Jones B., Ezzell J., Porter N., (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 68, 1000 – 1039.
- ▶ Richter P., Jiménez M., Salazar R., Maricán A, (2006). Ultrasound-assisted pressurized solvent extraction for aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. *Journal of Chromatography A*, 1132 (2006) 15–20.

- ▶ Sanchez C., Ericsson M., Carlsson H., Colmsjö A., (2002). Dynamic sonication – assisted solvent extraction of organophosphate esters in air samples. *Journal of Chromatography A*, 957, 227 – 234.
- ▶ Souza M., Kuch B., (2005). Heavy metals, PCDD/F and PCB in sewage sludge samples from two wastewater treatment facilities in Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere* 60, 844–853.
- ▶ Spörting S., Bowadt S., Bo Svensmark, Erland Björklund. (2005). Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A*, 1090, 1–9.
- ▶ Switzenbaum M., Moss L., Epstein E., Pincince A. and Donovan J., (1996). Summary paper: Establishing biosolids criteria. Department of civil and environmental engineering. University of Massachusetts.
- ▶ Toledo C., (2006). Desarrollo de una metodología para la extracción de bifenilos policlorados (PCBs) desde aceites de transformadores y su posterior cuantificación por cromatografía de gases acoplado a un detector de masa. T, 25-35.
- ▶ U.S. Environmental Protection Agency, (1996). SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Method 3630C: Silica Gel Cleanup. Revision 3. 3000 Series Methods.
- ▶ U.S. Environmental Protection Agency. (1996). SW-846: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Method 3540C: Soxhlet Extraction. Revision 3. 3000 Series Methods.
- ▶ U.S. Environmental Protection Agency (1999). Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Municipal and Industrial Solid Waste Division. Office of Solid Waste. EPA530-R-99-009.
- ▶ Yirgaalem A., Raghavan D., (2000). Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction. *Journal of Hazardous Materials B80*, 147–157.