



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

**MASTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
COLOIDES E INTERFASES**

Trabajo Fin de Máster:

**INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE OZONIZACIÓN SOBRE LA BIODEGRADACIÓN Y
TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS Y NO IÓNICOS**

Realizado por:

ALEJANDRO BURGOS CARA

Dirigido por:

Doctora MANUELA MARÍA LECHUGA VILLENA

Doctor ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA

Del departamento de Ingeniería Química

Doctora JULIA MALDONADO VALDERRAMA

Del departamento de Física Aplicada

Granada, Junio 2012

INFLUENCIA DE LOS PROCESOS DE OZONIZACIÓN SOBRE LA BIODEGRADACIÓN Y TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS Y ANIÓNICOS.

Memoria que presenta el Ingeniero Químico Alejandro Burgos Cara como Trabajo Final del Máster en Ciencia y Tecnología de Coloides e Interfases.

Granada, Junio 2012.

Fdo. Alejandro Burgos Cara

LOS TUTORES DEL TRABAJO

Dra. MANUELA MARÍA LECHUGA VILLENA Dr. ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA

Del departamento de Ingeniería Química

Dra. JULIA MALDONADO VALDERRAMA

Del departamento de Física Aplicada

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	13
2. OBJETIVOS	17
3. INTRODUCCIÓN.....	21
3.1. Clasificación de los tensioactivos	22
3.1.1. Tensioactivos aniónicos.....	22
3.1.2. Tensioactivos no-iónicos.....	22
3.2. Características y propiedades de los tensioactivos utilizados.....	23
3.2.1. Alquil (poli) Glucósidos (APG).....	23
3.2.2. Alcoholes Grasos Etoxilados (AEG).....	23
3.2.3. Sulfonato de Alquilbenceno Lineal	24
3.2.4. Ácidos Alquil Éter Carboxílicos	24
3.3. Aplicaciones de los Tensioactivos	25
3.4. Producción y consumo de tensioactivos.....	28
3.4.1. El sector de detergentes en España	28
3.4.2. Evolución del sector.....	29
3.5. Implicaciones medioambientales de los tensioactivos	31
3.5.1. Normativa sobre tensioactivos y medio ambiente.	31
3.6. Biodegradación de tensioactivos	34
3.6.1. Introducción	34
3.6.2. Biodegradabilidad en el medio acuático.....	35
3.6.3. Evaluación de la biodegradabilidad (Ensayos de biodegradación).....	35
3.6.4. Técnicas analíticas para el seguimiento de la biodegradación.....	42
3.6.5. Variables que influyen en la biodegradación	45
3.7. Toxicidad de tensioactivos	49
3.7.1. Introducción.....	49
3.7.2. Mecanismos de toxicidad en organismos acuáticos.....	50
3.7.3. Relación entre estructura y toxicidad	51

3.8. Efectos del Ozono sobre Tensioactivos.....	53
3.8.1. Introducción	53
3.8.2. Técnicas analíticas para el seguimiento de la ozonización	56
3.8.3. Biodegradación y toxicidad de tensioactivos tras la ozonización.....	56
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
4.1. Tensioactivos utilizados	61
4.2. Procedimiento para la ozonización.....	64
4.2.1. Fundamento	64
4.2.2. Equipos	64
4.3. Métodos de análisis.....	68
4.3.1. Análisis de tensioactivos.....	68
4.4. Determinación de los parámetros de calidad de un método analítico	79
4.4. Determinación de la toxicidad	81
4.4.1. Ensayo de toxicidad LUMIStox	81
4.4.2. Ensayo de toxicidad con <i>Pseudomonas putida</i>	86
4.5. Métodos de ensayo de la biodegradabilidad	91
4.5.1. Ensayo estático	91
4.6 Determinación de la tensión superficial	97
4.6.1. Fundamento del método	97
4.6.2. Equipo	97
4.6.3. Procedimiento.....	98
4.7. Determinación de la CMC por conductimetría	99
4.8. Protocolo de limpieza	101
4.8.1. Limpieza del material corriente de laboratorio.....	101
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES	105
5.1. Métodos de análisis.....	105
5.1.1. Recta de calibración para la determinación del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	105
5.1.2. Recta de calibración para la determinación del LAS-R ₁₁₋₁₄	106
5.1.3. Recta de calibración para la determinación del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	107

5.1.4. Recta de calibración para la determinación del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	108
5.2. Tensión superficial	109
5.2.1. APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	109
5.2.2. LAS-R ₁₁₋₁₄	110
5.2.3. FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	112
5.2.4. EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	114
5.3. Conductividad	115
5.4. Ozonización de tensioactivos	117
5.4.1. APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	117
5.2.2. LAS-R ₁₁₋₁₄	120
5.2.3. FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	123
5.2.4. EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	126
5.5. Biodegradabilidad de tensioactivos	129
5.5.1. Biodegradabilidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	130
5.5.2. Biodegradabilidad del LAS-R ₁₁₋₁₄	133
5.6. Toxicidad de Tensioactivos	136
5.6.1. Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	136
5.6.2. Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄	156
5.6.3. Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	172
5.6.4. Toxicidad del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	184
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	199
6.1. Desarrollo de métodos de análisis para la determinación de la concentración de tensioactivos.	199
6.1.1 Método simplificado de análisis para la determinación del LAS-R ₁₁₋₁₄ como tensioactivo aniónico (MBAS).	199
6.1.2. Método de análisis de la Antrona para APG's	205
6.1.3. Método de análisis del Yodo-Yoduro para tensioactivos no iónicos	209
6.1.4 Método simplificado de análisis para la determinación del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀ como tensioactivo aniónico (MBAS).	213
6.2. Determinación de las CMC para los tensioactivos ensayados.....	217

6.2.1 APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	217
6.2.2. LAS-R ₁₁₋₁₄	217
6.2.3. FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	219
6.2.6. EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	220
6.2.5. Conclusiones	220
6.3. Influencia de la ozonización sobre los tensioactivos ensayados.....	221
6.3.1 APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	221
6.3.2. LAS-R ₁₁₋₁₄	226
6.3.3. FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	230
6.3.4. EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	234
6.3.5. Cinéticas de degradación	237
6.3.6. Conclusiones	241
6.4. Influencia de la ozonización sobre la biodegradabilidad de tensioactivos.....	242
6.4.1. Parámetros característicos del proceso de biodegradación.	242
6.4.2. Biodegradabilidad primaria.	244
6.4.3. Biodegradabilidad última.....	249
6.4.4. Parámetros característicos del proceso de biodegradación calculados	254
6.4.5. Conclusiones	255
6.5. Influencia de la ozonización sobre la toxicidad de tensioactivos.....	256
6.5.1 Inhibición del crecimiento sobre bacterias bioluminiscentes <i>Vibrio fischeri</i>	256
6.4.2. Inhibición del crecimiento sobre bacterias <i>Pseudomona putida</i>	277
6.5. Influencia de la tensión superficial sobre la toxicidad de tensioactivos	281
6.5.1. Tensión superficial frente a concentración de los tensioactivos ensayados	281
6.5.2. Conclusiones	281
7. LISTADO DE TABLAS.....	285
7.1. Introducción	285
7.2. Materiales y métodos	285
7.3. Resultados experimentales	285
7.4. Discusión de resultados y conclusiones	290

8. LISTADO DE FIGURAS.....	295
8.1. Introducción	295
8.2. Materiales y métodos	295
8.3. Discusión de resultados y conclusiones	296
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	303

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Los tensioactivos son el componente más importante en la formulación de productos de limpieza tanto para productos domésticos como para productos industriales, comprendiendo entre el 15 y el 40% del contenido total de un detergente.

De acuerdo con la parte polar de la molécula, pueden clasificarse en cuatro grupos: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos; centrándose el presente trabajo en los aniónicos y no iónicos

Hoy en día, los detergentes normalmente contienen mezclas concretas de diferentes tipos de tensioactivos de manera que se vea optimizada su detergencia o capacidad de limpieza y sean inocuos para la piel. Sin embargo prácticamente ninguno es inocuo para la flora y fauna de ecosistemas acuáticos.

El uso masivo de tensioactivos en detergentes, y otros productos como las formulaciones cosméticas por ejemplo, implica la necesidad de tensioactivos que sean biodegradables y de la más baja toxicidad posible.

La ecotoxicidad, definida como el impacto medioambiental de productos químicos, es sin embargo relativamente alta en el caso de tensioactivos como resultado de su actividad superficial y su acción contra membranas biológicas (Jurado, 2011).

Esta constatado bibliográficamente (Narkis, N y Col., 1980; 1987) que el ozono es un oxidante muy efectivo de tensioactivos. Sin embargo es raro producir una mineralización completa, existiendo por tanto un alto numero de subproductos de la ozonización.

Los productos de la reacción pueden ser mas o menos tóxicos que el tensioactivo de partida y presentar mayor o menor biodegradabilidad, por lo tanto en el presente trabajo fin de máster se ha ensayado la influencia que tiene el uso del ozono en la degradación tensioactivos aniónicos y no-iónicos, de cara a estudiar el impacto que tiene sobre la biodegradación y la toxicidad de los mismos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el presente Trabajo Fin de Máster como objetivo fundamental se pretende analizar y evaluar la biodegradabilidad y toxicidad de tensioactivos no iónicos comerciales: alquilpoliglucósidos (APG) y alcoholes grasos etoxilados (AGE) y tensioactivos aniónicos comerciales: derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), ampliamente utilizado en formulaciones comerciales, con objeto de comparación y referencia.

- Seguimiento de la evolución de la degradación por ozono de distintas familias de tensioactivos.
- Comparación de la biodegradabilidad de distintas familias de tensioactivos antes y después de ser ozonizados aplicando los métodos oficiales: ensayo estático (UNE 55-844-91)
- Comparación de la toxicidad de distintas familias de tensioactivos antes y después de ser ozonizados mediante ensayos de inhibición con *V.fischei* y *P.putida*.

3. INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son el componente mas importante en la formulación de productos de limpieza tanto para productos domésticos como para productos industriales, comprendiendo entre el 15 y el 40% del contenido total de un detergente. En el año 2011 se consumieron en torno a medio millón de toneladas de detergentes en España.

Históricamente, dos de los tensioactivos mas usados han sido los sulfonatos de alquilbenceno lineal (LAS) y los alquilfenoles etoxilados (NPEO_x). Sin embargo el hay un uso creciente en el uso de tensioactivos no iónicos y de los llamados detergentes verdes.

Las propiedades conocidas de los tensioactivos y sus aplicaciones generales hacen necesaria una forma eficiente y lo más barata posible para su eliminación y descomposición.

Los métodos de eliminación de tensioactivos pueden dividirse en tres grupos: mecánicos, químicos y fisicoquímicos, y biológicos. Siendo los biológicos los más utilizados.

Sin embargo, hay tensioactivos que inhiben o disminuye la actividad microbológica en biorreactores de depuración, por lo cual el ozono, como etapa previa a los biorreactores de degradación en cualquier sistema de depuración en el que existan tensioactivos en disolución puede ejercer un efecto positivo al degradar parte de los tensioactivos y transformarlos en productos menos tóxicos y mas biodegradables.

El presente trabajo fin de máster se centra en la influencia que tiene el uso del ozono en la degradación de tensioactivos aniónicos y no-iónicos, de cara al impacto sobre la biodegradación y la toxicidad de los mismos.

3.1. Clasificación de los tensioactivos

Desde el punto de vista comercial los tensioactivos se venden de acuerdo a su uso, es decir a su propiedad de mayor interés práctico en cuanto a la aplicación: jabón, detergente, emulsionante, bactericida, inhibidor de corrosión, dispersante, tensoactivo, humectante, etc.

Sin embargo, la mayoría de los tensioactivos poseen varias de estas propiedades a la vez y por lo tanto una clasificación de este tipo sería muy confusa. Se prefiere clasificar los tensioactivos de acuerdo a su tipo de molécula, más particularmente en base al tipo de disociación de la molécula en solución.

De acuerdo con su cabeza polar, pueden clasificarse en cuatro grupos: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos.

En el presente trabajo, los tipos de tensioactivos elegidos han sido:

- Tensioactivos aniónicos
- Tensioactivos no-iónicos

3.1.1. Tensioactivos aniónicos

Son aquellos que en solución acuosa se disocian en un anión anfífilo y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario. A este tipo pertenecen los tensioactivos de mayor producción: detergentes como alquilbenceno sulfonatos, jabones o sales de ácidos carboxílicos grasos, espumantes como el lauril éster sulfato etc.

De este tipo de tensioactivos se han elegido los siguientes tensioactivos:

- PETRELAS550 (LAS-R₁₁₋₁₄), Cepsa; de la familia de los Alquilbenceno Sulfonato Lineales.
- AKYPO® RLM-100 (EC-R₁₂₋₁₄E₁₀), Kao Korporation de la familia de los Ácidos Alquil Éter Carboxílicos.

3.1.2. Tensioactivos no-iónicos

Por orden de importancia industrial vienen justo después de los aniónicos, cuya producción hoy en día está aumentando. En solución acuosa no forman iones, ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como: alcohol, tiol, éter o éster. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados (lavaplatos, champús). Ciertos derivados del sorbitol producen tensioactivos no-tóxicos para uso farmacéutico o alimenticio.

De este tipo de tensioactivos se han elegido los siguientes tensioactivos:

- Glucopone® 600 CS UP(APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}), SIGMA de la familia de los Alquilpoliglucósidos.
- FINDET® 1214N-23 (FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁), Kao Korporation de la familia de los Alcoholes Grasos Etoxilados.

3.2. Características y propiedades de los tensioactivos utilizados

3.2.1. Alquil (poli) Glucósidos (APG)

Los alquil glucósidos y poliglucósidos son estables a pH alto, pero no a pH bajo ya que se hidroliza la estructura liberando el azúcar y el alcohol graso. Sus soluciones acuosas no presentan una reducción de hidrofiliidad al aumentar la temperatura, lo que los diferencia notablemente de los tensioactivos etoxilados.

Estas y otras características hacen que estas sustancias sean usadas en la formulación de detergentes para todo uso gracias al efecto sinérgico que se produce al asociarlos con tensioactivos aniónicos, que es más pronunciado que el observado con tensioactivos no-iónicos clásicos.

Esta sinergia ha facilitado la formulación de productos con la misma concentración de materia activa pero más efectivos o productos con sustancias activas reducidas sin influir en su calidad.

Han sido usados igualmente en la formulación de productos de cuidado personal valiéndose de su escasa agresividad contra la piel y el cabello, además de su compatibilidad ecológica. Estos compuestos son capaces de estabilizar espumas dando aspectos aun más cremosos que los obtenidos con alquil éter sulfatos

3.2.2. Alcoholes Grasos Etoxilados (AEG)

Los alcoholes grasos etoxilados son utilizados ampliamente por sus propiedades humectantes y emulsificantes. Poseen propiedades útiles como dispersantes, solubilizantes, agentes emulsificantes y lubricantes para fibras.

Se utilizan en limpiadores de superficies duras, limpiadores para suelos, desengrasante y en detergentes pesados líquidos y en polvo.

3.2.3. Sulfonato de Alquilbenceno Lineal

Los sulfonatos de alquilbenceno lineales son muy solubles en agua, incluso a baja temperatura, tienen muy buena acción detergente, elevado poder espumante, gran biodegradabilidad, facilidad de procesamiento y escaso costo de fabricación. Son muy estables y compatibles con todo tipo de ingredientes presentes en los productos en los que se emplean.

En vista de sus buenas propiedades detergentes y el escaso impacto sobre el medio ambiente, los sulfonatos de alquilbenceno lineales son muy usados para fabricación de todo tipo de detergentes para lavado de ropa y vajillas, champús, etc. Para estos usos, se usan cadenas alquílicas de 10-13 átomos de carbono, pues las cadenas más largas son poco solubles. Los alquilbencenos con más de 13 átomos de carbono son solubles en disolventes orgánicos y se emplean como lubricantes en procesos de corte y taladrado, para fabricación de pesticidas, procesos de flotación de minerales, etc.

3.2.4. Ácidos Alquil Éter Carboxílicos

Se utilizan como tensioactivos de baja formación de espuma, y en productos que van a estar en contacto con piel y ojos ya que son poco irritantes.

3.3. Aplicaciones de los Tensioactivos

Los tensioactivos, poseen una gran versatilidad y se utilizan en multitud de aplicaciones: productos farmacéuticos, formulaciones detergentes, operaciones con metales, flotación, alimentación, etc.

En la Tabla 3.1 se muestran los diferentes campos de aplicación en diversas industrias y los tensioactivos más utilizados en ellas (Ortega, 2009).

Tabla 3.1. Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (Ortega, 2009)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVO	CAMPOS DE APLICACIÓN
Alimentaria	Acilgliceroles	Emulsionantes
	Esteres de sorbitano	Humectantes
	Copolímeros de óxido de etilenopropileno,	Antiespumantes
	Alquilsulfatos, Esteres de poliglicol	Limpieza de instalaciones
Curtidos	Nonilfenoles polietoxilados	Humectación/penetración
	Alcoholes grasos polietoxilados	Desengrase
	Monoésteres de ácidos grasos sulfatados	Curtición
	Alquilsulfatos	Tintura
	Alquilnaftalensulfonatos, Ligninsulfonatos, Aceites saturados	Engrase Pastas de pigmento
Pinturas, tintes y lacas	Condensados de naftalensulfonato y formaldehído	Dispersión de pigmentos
	Alquilsulfato, Dialquilsulfosuccinato sódico, Alcoholes grasos polietoxilados, Aminas polietoxiladas	Modificadores de fluidez Emulsionantes de resinas
	Alquilbenceno sulfonatos	Emulsificación de plaguicidas y herbicidas
Agricultura	Nonilfenoles polietoxilados, Esteres fosfatados, Poliglicoles, Aceites sulfatados	Humectación y dispersión Emulsiones oleosas
	Esteres de poliglicol	Emulsiones de cremas cosméticas
Cosmética	Óxidos de amina	Champúes, geles
	Alcoholes grasos polietoxilados	Jabones de tocador
	Alquilpoliéter sulfatos, Alcano lamidas, Alquilbetainas, Dialquilsulfosuccinatos	Solubilizantes de perfumes Emulsionantes para aceites esenciales

Tabla 3.1. (Continuación) Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (Ortega, 2009)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVO	CAMPOS DE APLICACIÓN
Detergentes	Alquilbenceno sulfonatos Olefin-silfonatos Parafin-sulfonatos Sulfatos de alcoholes grasos polietoxilados Alquil polietier sulfatos Óxidos de amina, Alquilfenoles polietoxilados, Alcano lamidas, Sulfonatos de ácidos grasos, Sales de amonio cuaternario	Detergentes en polvo Detergentes líquidos Estabilizadores de espuma Productos limpieza de superficies duras Sanitarios Productos lavavajillas Limpiadores textiles
Papelera	Esteres de poliglicoles Alcoholes grasos polietoxilados Polipropilen-glicoles, Aminas polietoxiladas, Nonilfenoles polietoxilados	Agentes humectantes de la pulpa Eliminación de espuma de la pulpa Emulsionantes de ceras Reutilización del papel
Petróleo y derivados	Alquilpoliéter sulfatos Ligno-sulfonatos Alcano lamidas Imidazolinias, Poliglicoles, Ésteres sulfonados, Alquilbenceno sulfonatos	Solubilizantes del agua e inhibidores de corrosión Ruptura de emulsiones Dispersantes Recuperación del petróleo Eliminación de mareas negras
Plásticos y gomas	Alquilbenceno sulfonatos Alcoholes grasos polietoxilados Alquilsulfatos Copolímeros óxido de etileno-propileno Amidas polietoxiladas, Dialquilsulfosuccinato sódico, Sales de amonio cuaternario	Emulsionantes para la producción de emulsiones de polímeros Agentes antielectrostáticos Modificadores de viscosidad Controladores del olor Polimerización en emulsión
Textiles	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados Sales de amonio cuaternario Aceites naturales polietoxilados, Alcoholes frasos polietoxilados, Esteres de poliglicol, Esteres sulfonados, Sulfonatos de petróleo	Detergentes y auxiliares de humectación Agentes antielectrostáticos Suavizantes y lubricantes Aceites autoemulsionables Jabones para limpieza en seco

La detergencia es (al menos en cuanto a tonelaje) junto a la cosmética, la aplicación principal de los tensioactivos (Deleu, 2004). La perfumería se relaciona como rama auxiliar de éstos y en menor proporción, el mercado de los alimentos y el de los fármacos.

Un detergente se define como aquel agente que es capaz de realizar una acción detergente, es decir, que es capaz de lavar. Por ejemplo, el agua pura es un detergente, ya que por sí sola puede lavar, aún sin ser ella misma un tensioactivo. Pero no obstante, los detergentes comerciales son normalmente mezclas complejas de tensioactivos con otros aditivos: álcalis, secuestrantes de iones, dispersantes, oxidantes, blanqueantes, colorantes, perfumes, cargas, etc.

Otra ventaja muy importante que presentan los detergentes, es que al ser productos de síntesis, pueden ser diseñados estructuralmente para aplicaciones concretas permitiendo una gran flexibilidad en la fabricación, independientemente del diseño completo de cada formulación específica.

La Tabla 3.2 muestra composiciones orientativas de algunos ejemplos de formulaciones detergentes.

Tabla 3.2. Composición de algunos detergentes (Bailón, 2003)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Detergente textil lavadora	Tensioactivos aniónicos (LAS y FAS), jabones, álcalis, secuestrantes, dispersantes, blanqueantes basados en oxígeno, activadores, blanqueantes ópticos, enzimas, colorantes, perfume, cargas
Suavizante textil	Tensioactivos catiónicos, perfume, colorante
Lavavajillas manual	Tensioactivos aniónicos (LAS y LESS), tensioactivos no iónicos (Dietanolamida de coco), conservante, perfume, colorante
Limpia hogar	Tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, glicoles, secuestrantes, perfume, colorante
Limpia cristales	Alcoholes, tensioactivos aniónicos, perfume
Lavavajillas de máquina	Tensioactivos no iónicos, álcalis, secuestrantes, dispersantes, oxidantes, colorantes

3.4. Producción y consumo de tensioactivos

La producción mundial de tensioactivos alcanza unos 12.5 millones de toneladas por año, con un incremento anual estimado de 500.000 toneladas (Edser, 2006).

En Europa se estimó una producción total de tensioactivos de 2.48 millones de toneladas para el año 2000, de los cuales un 49.6% corresponde a no iónicos, un 40.2% a tensioactivos aniónicos, un 8.3% a catiónicos y un 1.8 % a la producción de anfóteros (Umsicht, 2003). En 2007, la producción supero los 3 millones de toneladas únicamente en Europa Occidental (CESIO, 2008).

Considerando la producción total de tensioactivos, alrededor del 60% corresponde a tensioactivos utilizados en detergentes domésticos, mientras que un 30% es empleado en aplicaciones técnicas e industriales, un 7% en limpieza industrial y 6% en productos de higiene corporal (Edser, 2006). En la Figura 3.1 se representa el consumo total de tensioactivos para el año 2006 en las principales regiones del mundo.

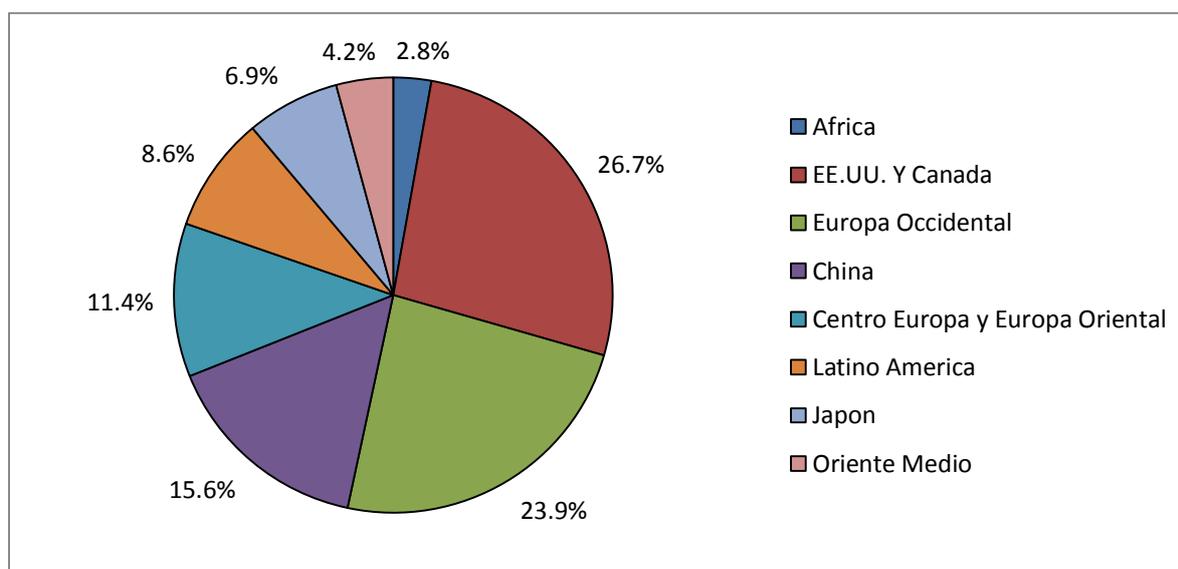


Figura 3.1. Consumo mundial de tensioactivos durante el año 2006. (Janshekar y Col., 2006).

3.4.1. El sector de detergentes en España

El sector de detergentes y productos de limpieza fabrica una amplia variedad de productos, la mayoría destinados al consumo domestico pero con una parte cada vez mas importante de productos para uso industrial e institucional.

Es un sector orientado fundamentalmente al mercado nacional, cuyo comercio exterior, aunque reducido, presenta un saldo positivo. Es un sector típicamente transformador.

3.4.2. Evolución del sector

Tras varios años de pesimismo, el pensamiento actual del sector de la detergencia refleja un claro optimismo dadas las buenas expectativas respecto a la evolución futura del sector. Ello es debido en parte al comportamiento del sector en 2010, que fue claramente mejor que en el año 2009.

En líneas generales, los primeros meses del año 2010 mostraron cifras algo más optimistas, ya que la consultora IRI, en su TAM de febrero de 2010 apuntaba un incremento del 0,7% en valor, si bien la reducción de las unidades vendidas se situaba en el 1,3%.

Según estos datos, las únicas categorías que experimentaron crecimiento fueron las de detergentes para el lavado a mano (3,4% en valor y 7,6% en volumen, aunque no pudieron compensar el desplome del resto de productos de detergencia para la ropa), lavavajillas y desinfectantes, y líquidos fuertes, todos con incrementos tanto en volumen como en valor (Ingeniería Química, 2011).

En la Figura 3.2 se representa la evolución del consumo de detergentes (excluidos los jabones) en España, durante los años 2000-2012. Existe un claro aumento del consumo total de detergentes durante los últimos años, pasando de un valor de 340 a 427 millones de kilogramos, lo que supone un aumento total del 80% (INE, 2012).



Figura 3.2. Evolución del consumo de detergentes en España durante los años 1993-2010. (INE, 2012).

En 2005, se fabricaron más de 2,5 millones de toneladas de LAS en todo el mundo, esperando llegar a 3,4 millones de toneladas para 2010. Del consumo total de tensioactivos, un 40% corresponde a estos compuestos.

Asimismo, a nivel nacional, se observa un consumo fluctuante para los tensioactivos aniónicos, sin apenas incremento en valores absolutos durante la última década (Fig. 3.3). Para el resto de tensioactivos el consumo aumenta claramente, siendo más acusado en el caso de los tensioactivos catiónicos, superando ligeramente el consumo de aniónicos a partir del año 2002 (INE, 2006).

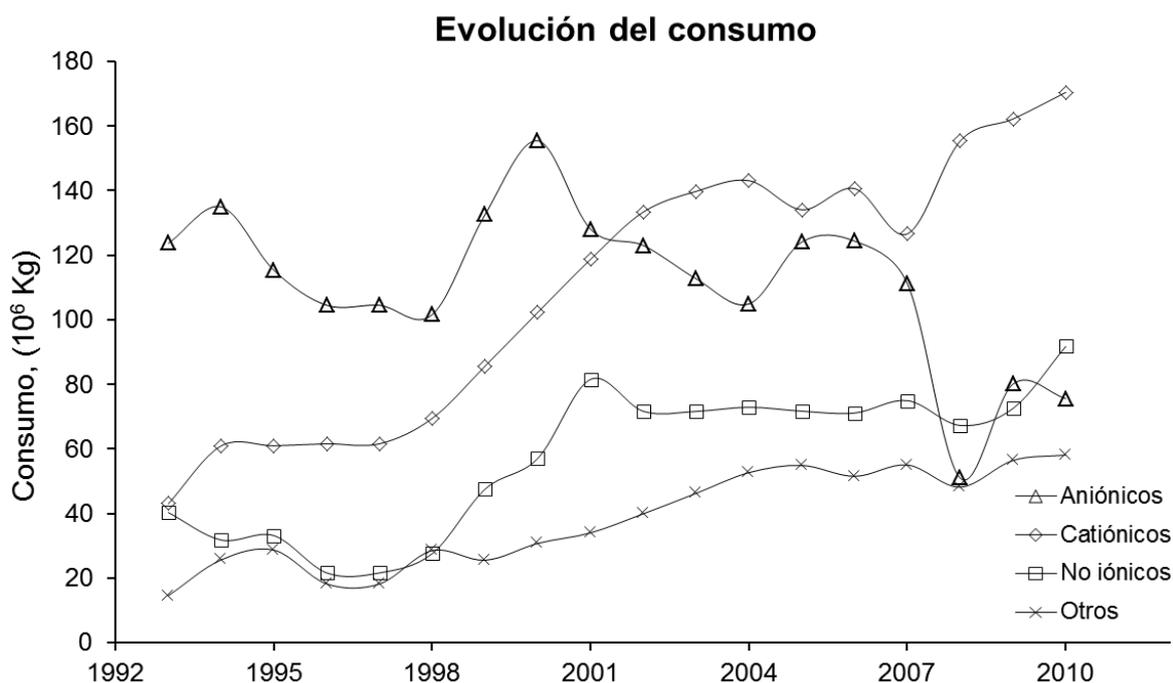


Figura 3.3. Evolución del consumo de tensioactivos por tipo en España durante los años 1993-2010 (INE, 2012).

3.5. Implicaciones medioambientales de los tensioactivos

Las aplicaciones y ventajas de los tensioactivos son ampliamente conocidas, tanto a nivel industrial como a nivel económico y sanitario. Sin embargo, desde un punto de vista medioambiental, estos son considerados como unos de los principales contaminantes de los medios acuáticos.

Tras la utilización de tensioactivos, estos llegan, en el mejor de los casos a las estaciones depuradoras a través de las aguas residuales urbanas e industriales, aunque también hay que tener en cuenta que en determinados casos son vertidos directamente al suelo, pudiendo llegar a las aguas superficiales.

Principalmente los tensioactivos se han usado: en la industria textil, con el propósito de adoptar procesos generales de limpieza, hilado, tejido y terminado de un amplio rango de fibras; en la agricultura, como emulsificadores en la producción de pesticidas líquidos y para mejorar las propiedades de mojado y adhesión a los microorganismos indeseados; en la industria papelera, como dispersante en el procesado de la pasta y para el destintado (Talmage, 1998).

Muchos fenómenos indeseados en las aguas residuales están relacionados con la presencia de tensioactivos. Estos tienen una acción destructiva sobre la fauna y la flora presente en las aguas superficiales provocando su eutrofización. Algunos tensioactivos provocan la inhibición del crecimiento de algas incluso a concentraciones de 1mg/L, y las dosis tóxicas en peces suelen estar en el rango de 2 a 8 mg/L (Ledakowicz, 2005). En humanos, los tensioactivos presentan solo una ligera toxicidad, sin embargo pueden provocar alergias cutáneas.

Durante el tratamiento de las aguas residuales, un elevado porcentaje de estos compuestos es eliminado mediante procesos de biodegradación y adsorción en los sólidos en suspensión presentes en las aguas, mientras que los metabolitos generados son dispersados en los diferentes compartimentos ambientales (Ying, 2006).

Los metabolitos de tensioactivos no iónicos, como por ejemplo el nonilfenol o el nonilfenol monoetoxilado, son especialmente peligrosos por su carácter disruptivo a nivel endocrino y por lo tanto potencialmente dañinos para el medioambiente (Fuerhacker y col., 2001)

3.5.1. Normativa sobre tensioactivos y medio ambiente.

La primera legislación fue establecida en Alemania en 1961, donde se exigía que la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos fuese del 80%. Posteriormente surgieron

directivas relativas a la biodegradabilidad de tensioactivos utilizados en las formulaciones de detergentes.

Actualmente el que esta en vigor es el Reglamento (CE) nº648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes en su versión consolidada del 27 de Junio de 2009, que derogó las Directivas 73/404/CEE, 73/405/CEE, 82/242/CEE, 82/243/CEE y 86/94/CEE y la Recomendación 89/542 de la Comisión relativa al etiquetado de detergentes, y con el que se armonizó de manera uniforme y simultánea la normativa de todos los Estados miembros, simplificando futuras adaptaciones.

El objetivo principal de este reglamento es conseguir una mayor protección del medio ambiente incluyéndose una legislación más restrictiva, abarcando todos los tipos de tensioactivos e imponiendo para los detergentes unos métodos de ensayo más estrictos sobre la biodegradabilidad final, y no ya sobre la inicial.

De forma resumida el reglamento establece que:

- La biodegradabilidad primaria se considerará satisfactoria en un nivel mínimo del 80 %, medida de conformidad con los métodos de ensayo especificados en el Anexo II.
- La determinación de los tensioactivos aniónicos en los ensayos se realizará con el análisis de sustancias activas al azul de metileno (MBAS).
- La determinación de los tensioactivos no iónicos en los ensayos se realizará con el método de sustancias activas al bismuto (BiAS).
- La determinación de los tensioactivos catiónicos en los ensayos se realizará con el análisis de sustancias activas al azul de disulfina (DBAS)
- La determinación de tensioactivos anfotéricos en los ensayos se hará mediante análisis utilizando los procedimientos siguientes:
 - 1) Si no hay catiónicos: Método usado en la República Federal de Alemania (1989) DIN 38 409–Teil 20.
 - 2) En los demás casos: El método Orange II (Boiteux, 1984).
- Los tensioactivos de los detergentes se considerarán biodegradables si el nivel de biodegradabilidad (mineralización), es de al menos un 60 % en un plazo de 28 días, medida según los métodos de ensayo especificados en el Anexo III.

3.5.1.1. Legislación a nivel Estatal.

A nivel estatal la Legislación (BOE, 1985) especifica que la biodegradabilidad de un producto tensioactivo aniónico ha de ser de un 80% del porcentaje de biodegradación de un dodecil-benceno sulfonato sódico lineal.

Para los vertidos resultantes de la actividad industrial a los cauces públicos, el límite de concentración en tensioactivos aniónicos está en el margen de 2-6 mg/L, dependiendo de las características del entorno (BOE, 1986); en cambio, para los vertidos industriales a la red de saneamiento y que, por tanto, han de someterse posteriormente a un tratamiento en EDAR, se admiten valores límites de concentración de tensioactivos más elevados, en el margen 10-30 mg/L, dependiendo de las Administraciones locales, y en su defecto, de las Comunidades Autónomas.

La concentración límite admisible para el contenido de tensioactivos en aguas superficiales continentales empleadas en la obtención de agua potable para el consumo público, está entre 0.2 y 0.5 mg/L, según el tipo de tratamiento a que se someta (BOE, 1988).

Para aguas ya tratadas que se destinan a consumo público, la reglamentación establece una concentración límite de tensioactivos aniónicos de 0.2 mg/L (BOE, 1990).

3.5.1.2. Legislación a nivel de Andalucía

En la Comunidad Autónoma Andaluza el Decreto 14/1996, de 16 de Enero, aprobó el reglamento de calidad de las aguas litorales (BOJA, 1996). Tras definir el marco normativo de actuación para preservar y mejorar la calidad de las aguas litorales en la Ley de Protección Ambiental de la comunidad andaluza, se establecen los límites de vertido y los métodos de análisis correspondientes.

En el Anexo I del Reglamento se establece que no podrán autorizarse vertidos al dominio público marítimo-terrestre cuya carga contaminante en detergentes supere los límites siguientes: 5 mg/L (media mensual); 20 mg/L (media diaria) y 50 mg/L (valor puntual). Como método de análisis para detergentes se especifica la espectrofotometría de absorción molecular con un límite de detección de 0.001 mg/L. Se trata por tanto de una legislación general que no distingue entre los distintos tipos de tensioactivos y que únicamente contempla un método de análisis de biodegradabilidad primaria y no final.

En 1997 se publicó la Orden de la Consejería de Medio Ambiente de 14 de Febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos (BOJA, 1997). Con arreglo a las exigencias y limitaciones de vertidos establecidas en las normas comunitarias y en el ordenamiento español, se fijan para los detergentes los siguientes límites de vertido en función de la clasificación de las aguas: 100 µg/L (aguas especiales); 300 µg/L (aguas limitadas); 200 µg/L (aguas normales); 200 µg/L (aguas menos limitadas).

3.6. Biodegradación de tensioactivos

3.6.1. Introducción

La biodegradabilidad química es uno de los criterios más importantes en la evaluación de riesgos ecotoxicológicos. (Scott and Jones, 2000). Está estrechamente relacionada con la estructura química del compuesto y es de gran importancia en el tratamiento biológico de todo tipo de aguas residuales, incluyendo éstas, las que contienen tensioactivos.

La biodegradación de tensioactivos, como método biológico de eliminación de tensioactivos, es el método mas barato; sin embargo, en muchos casos los tensioactivos son tóxicos para los microorganismos que conforma los reactores biológicos de biodegradación o las biopelículas. Por lo tanto, pese a que lo ideal seria producir tensioactivos que no fueran tóxicos y fácilmente biodegradables.

La biodegradación de uno de los tipos de tensioactivos más usados, los alquilfenol etoxilados conducen a un acortamiento de las cadenas etoxiladas hasta alquilfenol hasta, en última instancia nonil y octilfenol, los cuales tienen menor solubilidad en agua y se adsorben sobre sedimentos y sólidos en suspensión. El nonilfenol es aproximadamente 10 veces mas tóxico que su etoxilado precursor y se sabe que imita el comportamiento de los estrógenos (Scott y Jones, 2000).

La biodegradación y ecotoxicidad de tensioactivos ha sido estudiada en las ultimas décadas (Abd-Allah y Star, 1998; Balson y Felix, 1995; Fuerhacker y Col, 2001; Larson y Games, 1981; Remde y Debus, 1996; Salanitro y Díaz, 1995; Scott y Jones, 2000; Vashon y Schwab, 1982; Wagner y Schink, 1987; Zhang y Col., 1999)

Es bien sabido (Salanitro y Diaz, 1995; Zhang y Col., 1999), que los compuestos que contienen anillos aromáticos son menos susceptibles a la descomposición microbiológica que compuestos análogos sin anillos de benceno.

Del mismo modo, el tipo y longitud de la cadena hidrocarbonada son importantes. Conforme aumenta la longitud de la cadena, aumenta la biodegradabilidad. La ramificación de las cadenas, provoca sin embargo un descenso de la velocidad de biodegradación y la susceptibilidad de ser biodegradado.

Los tensioactivos no iónicos no son biodegradados en las plantas de tratamiento de aguas convencionales, requiriéndose tratamientos químicos que permitan alcanzar concentraciones que se ajusten a los parámetros de vertido legales. Por el contrario los tensioactivos aniónicos como el LAS son fácilmente biodegradados (Lechuga, 2005)

3.6.2. Biodegradabilidad en el medio acuático

La biodegradación constituye uno de los principales procesos de transformación de los compuestos xenobióticos en el medio acuático. Durante dicho proceso, los microorganismos utilizan los tensioactivos como fuente de energía (procesos catabólicos) y/o sustrato (procesos anabólicos) (Ying, 2006).

En el proceso de biodegradación de compuestos orgánicos intervienen numerosas variables tales como las características físico-químicas del medio (oxígeno disuelto, temperatura, pH, luz, concentración de nutrientes, etc.), las características físico-químicas del compuesto (solubilidad, concentración, etc.) y/o los microorganismos presentes (tipos, concentración, etc.).

3.6.3. Evaluación de la biodegradabilidad (Ensayos de biodegradación)

Para medir o evaluar la biodegradabilidad se recurre a los ensayos de biodegradación. Los tres componentes esenciales en un ensayo de este tipo para tensioactivos son: el tensioactivo, el método analítico para seguir el curso de la biodegradación, y el agente biológico. Estos tres componentes se combinan en muy variadas formas para obtener los procedimientos de ensayo. Lo más importante en un ensayo de biodegradación es que sea un método biológicamente correcto, que tenga en cuenta las propiedades especiales de los tensioactivos y que sea reproducible y adecuado para los trabajos de rutina.

La eliminación de las propiedades de los tensioactivos de comportarse como agentes de superficie durante el tratamiento de aguas residuales ha llegado a ser un requerimiento legal. Obviamente los primeros ensayos de biodegradación fueron diseñados para que la eliminación de estas propiedades de superficie, debido a la transformación microbiana, fuera un criterio de elección en los ensayos. Aquellos detergentes que pasaban los ensayos de biodegradación, especificados en la legislación, en efecto no causaban espuma durante el tratamiento de aguas residuales ni presentaban problemas de toxicidad en los efluentes.

La norma UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55884:1991), describe el procedimiento de ensayo de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos adoptando los requisitos que establecía la OCDE.

El procedimiento describe dos métodos de ensayo:

- **El ensayo estático o de selección (Screening Test):** consiste en un ensayo con un matraz abierto, es relativamente rápido y sencillo. Se considera un ensayo de aceptación y no de rechazo. En un principio se diseñó para la selección de tensioactivos aniónicos “blandos”.
- **El ensayo dinámico o de confirmación (Confirmatory Test):** está basado en la simulación de las condiciones existentes en una planta de depuración que opera mediante fangos activados. Es un ensayo que se usa para tensioactivos que no han superado el ensayo estático y permite confirmar o rechazar los resultados obtenidos en este ensayo.

De forma general cabe hacer una distinción entre ensayos estáticos y dinámicos. Los métodos estáticos son aquellos en los que las condiciones experimentales quedan fijadas desde el principio del ensayo, y los microorganismos pasan por las distintas fases típicas de su desarrollo, se trata de un funcionamiento en discontinuo. En los métodos dinámicos se hacen ajustes continuos o periódicos con objeto de mantener el desarrollo de los microorganismos en fase exponencial o estacionaria; por ejemplo, alimentación de los microorganismos por una renovación periódica o continua del medio.

El rigor del ensayo estático viene determinado por la duración del ensayo, el valor de biodegradación fijado para aceptar un tensioactivo y el inóculo utilizado. El valor de biodegradación para aceptar un tensioactivo se fijó en un 80% a los 19 días de ensayo, y la cantidad de inóculo debe ser tal que un tensioactivo aniónico “blando” (Marlon A), como patrón se toma alquilbenceno sulfonato lineal, se degrade entre 90-95 % en 14 días. El nivel de desaparición de un tensioactivo aniónico “duro” del tipo tetrapropilénbenceno sulfonato debe ser al menos del 35 % durante el tiempo de duración del ensayo.

Existen otras metodologías de ensayo distintas basadas en el control de parámetros analíticos no específicos para seguir el curso de la biodegradación y que además respondería a cualquier residuo o intermedio de biodegradación, indicando así la extensión de la biodegradación última del tensioactivo ensayado. Estas metodologías están recogidas en las denominadas “Guías de Ensayos” para la degradación y acumulación de compuestos tensioactivos que fueron elaboradas y recomendadas en 1981 (OECD, 1981). Las

metodologías desarrolladas fueron posteriormente incorporadas a las Directivas de la Unión Europea para tensioactivos utilizados en productos de limpieza domésticos e industriales (CEE, 1973b y CEE, 1982)

Las guías de ensayos de la OCDE abarcan tres tipos de ensayos, que se realizan en fases sucesivas, para determinar:

1. Biodegradabilidad fácil
2. Biodegradabilidad inherente
3. Comportamiento en condiciones reales (ensayos de simulación)

1. Biodegradabilidad fácil (Ready Biodegradability):

Son los llamados RBTs (Ready Biodegradability Tests). Están basados en parámetros de seguimiento de la biodegradación no específicos tales como el carbono orgánico disuelto, el consumo de oxígeno y/o producción de CO₂. En estos ensayos, al igual que en el ensayo estático, el tensioactivo es la única fuente de carbono y se utiliza una cantidad relativamente baja de biomasa microbiana.

Los ensayos recomendados para esta determinación son los siguientes:

- Ensayo estático o de selección modificado (Screening Test)
- Ensayo MITI modificado (I)
- Ensayo en reactor cerrado o botella cerrada (Closed Bottle Test)
- Ensayo de Sturm modificado
- Ensayo AFNOR modificado

Todos estos métodos tienen unas características similares:

- El compuesto en estudio es la única fuente de carbono orgánico
- El medio está compuesto sólo de nutrientes inorgánicos
- Inóculo de densidad celular < 10⁶ células/ml
- Inóculo sin pre-exposición
- Duración del ensayo inferior a 28 días: para permitir la comparación de los métodos, el grupo de expertos fijó un tiempo estándar de 28 días para la duración de los ensayos, aunque originariamente cada método tenía una duración diferente.

Si se utilizan estos ensayos puede considerarse que una sustancia es “fácilmente biodegradable”:

- Cuando la disminución de la materia activa, tras el ensayo, es superior al 80%
- Cuando la disminución de algún otro parámetro no específico es superior al 60-70%, esto es:
 - COD (carbono orgánico disuelto) (70%),
 - DBO (demanda bioquímica de oxígeno) (60%)
 - CO₂ (60%).

Esta clasificación es totalmente arbitraria de los tensioactivos que han pasado este tipo de ensayos e informan sobre la **biodegradabilidad última** de una sustancia en condiciones “difíciles”.

Los ensayos más estrictos publicados por la OCDE son los RBTs, además de los más importantes para uso práctico. Las sustancias que resultan biodegradables por estos métodos, se consideran que en el medio ambiente, sufrirán una degradación rápida y fácil. Sin embargo, y debido a las condiciones tan estrictas del ensayo, un resultado negativo no significa que la sustancia no sea degradable, lo cual requeriría de ensayos más amplios para su determinación.

2. Biodegradabilidad inherente (Inherent Biodegradability):

Si alguna o todas las condiciones de los ensayos de biodegradabilidad fácil se suavizan, el ensayo pasa a denominarse de “inherente biodegradabilidad”. Algunos de los factores que pueden incrementar la probabilidad de la degradación son: preexposición del inóculo al compuesto ensayado, mayores densidades celulares, reinoculación, mayor duración del ensayo, etc...

En este grupo de ensayos se incluyen:

- Ensayo MITI modificado (II)
- Ensayo SCAS modificado (Semicontinuous Active Sludge)
- Ensayo de Zahn-Wellens modificado

En los ensayos de biodegradabilidad inherente la densidad celular utilizada se encuentra entre 107 y 108 células por cada mililitro. No existe un límite de duración del ensayo puesto que se considera que la biodegradabilidad inherente es una propiedad específica de un

compuesto. Datos en torno al 20 % de disminución de la materia activa tras el ensayo, pueden considerarse como evidentes de una biodegradación inherente primaria, y datos superiores al 70% en la disminución de parámetros no específicos (consumo de oxígeno, carbono orgánico disuelto, etc...) son indicativos de una biodegradación inherente total.

Las pruebas de biodegradación inherente también permiten calcular la formación de compuestos intermedios. Estas pruebas indican si en condiciones óptimas una sustancia tiene el potencial de biodegradarse, y un resultado positivo indica que la sustancia no persiste indefinidamente. Si una sustancia no posee biodegradación inherente se considera no degradable (a menos que se degrade abióticamente).

3. Pruebas de simulación:

Dentro de este tipo de ensayos, encaminados a conocer el comportamiento de un tensioactivo en condiciones ambientales reales, cabe destacar:

- Ensayo del “Porous Pot”
- Ensayo dinámico o de confirmación modificado (Confirmatory Test)

Un tensioactivo, según este tipo de ensayos, es totalmente biodegradable en una EDAR con fangos activados, cuando su porcentaje de eliminación del carbono orgánico disuelto sea superior al 70%.

En 1981 se llevaron a cabo una serie de estudios comparativos de los RBTs para 44 compuestos diferentes encontrándose diferencias significativas en cuanto a su severidad o rigor. El ensayo más estricto fue el ensayo en reactor cerrado seguido de: ensayo MITI (I), ensayo estático modificado, ensayo AFNOR modificado y ensayo de Sturm modificado. Estos dos últimos ensayos son los menos estrictos debido a que utilizan una concentración de inóculo varios órdenes de magnitud superiores.

En 1985 comenzaron a revisarse las guías de ensayo publicadas en 1981, en especial lo referente a los RBTs (301A-301E) en el sentido de armonizar todos los ensayos y para adoptar un ensayo adicional que fuese adecuado para compuestos poco solubles, se propuso un ensayo de respirometría manométrica como una simplificación del ensayo MITI (I). 37 laboratorios participaron en un ensayo interlaboratorio para comprobar la validez de los métodos propuestos.

Además de las condiciones expuestas, otra condición arbitraria que se debe cumplir, es que la degradación del compuesto ensayado debería tener lugar dentro de los 10 días siguientes al

comienzo del ensayo (14 días para el ensayo en reactor cerrado), considerando como comienzo de la degradación aquel momento en el que desaparece el 10% del sustrato adicionado. Es el llamado criterio “10 days-window” o principio de los diez días. Este criterio está siendo cuestionado por numerosos investigadores y se presenta como inadecuado para clasificar un compuesto como “fácilmente biodegradable” en especial para mezclas comerciales y compuestos de escasa solubilidad (Richerich, 2001). En la última legislación europea, ya se considera como un principio no deseable. La concentración de compuesto y el inóculo es menos favorable en el ensayo estático modificado que en los otros ensayos, por lo tanto los efectos tóxicos reducen su aplicabilidad.

Algunos de los RBTs revisados en 1993 resultan muy apropiados para medir la biodegradabilidad última. El método en reactor cerrado resulta útil para tensioactivos aniónicos y no iónicos de buena solubilidad. En 1994 Struijs (Struijs, 1994) hizo un estudio comparativo entre los nuevos RTBs y el ensayo estático de la OCDE, y observó que en el ensayo en reactor cerrado las condiciones para la biotransformación de un tensioactivo son similares o incluso más favorables que en el ensayo estático, ya que la concentración de inóculo es diez veces mayor y la duración del ensayo se prolonga de 19 a 28 días. Se concluyó que los RTBs revisados deberían considerarse como métodos complementarios más que como meros sustitutos del ensayo estático y dinámico. Por otra parte la aplicación de los RTBs constituye una doble selección para distinguir entre tensioactivos que son fácilmente mineralizables y aquellos que son rápidamente convertidos en intermedios estables. Por tanto se propone un sistema de ensayos de doble selección: el ensayo estático de la OCDE y un ensayo adecuado de entre los RTBs revisados.

En la misma época en la que se publicaron los RBTs revisados de la OCDE se crearon una serie de ensayos estándar de biodegradabilidad por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), ensayos que son bastante similares a los creados por la OCDE.

En la tabla 3.3 se presenta una lista de métodos para la determinación de la biodegradación total.

Tabla 3.3. Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total.

A. Métodos revisados de la OCDE (fácil biodegradabilidad)
301 A COD Die-Away
301 B Evolución en la Producción de CO ₂ (Test de Sturm modificado)
301 C Ensayo MITIc (I) (DBO)
301 D Ensayo en Reactor Cerrado (DBO)
301 E Ensayo estático de la OCDE Modificado (COD)
301 F Respirimetría Manométrica (DBO)
B. Métodos de ensayo de la Unión Europea (fácil biodegradabilidad)
C3 Ensayo estático de la OCDE modificado (COD)
C4 Ensayo AFNOR modificado (NF T90/302) (COD)
C5 Ensayo de Sturm modificado (CO ₂)
C6 Ensayo en reactor cerrado (DBO)
C7 Ensayo MITIc (I) modificado (DBO)
C8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)
C. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)a
ISO 7827 Método mediante análisis de carbono orgánico disuelto
ISO 9408 Método mediante respirometría (demanda de oxígeno)
ISO 9439 Método mediante producción de CO ₂
ISO/CD 10,707 Método en reactor cerrado
ISO/CD 10,634 Guía para sustancias insolubles
D. Métodos de la OCDE (inherente biodegradabilidad)
302 A Ensayo de lodos activos en discontinuo (SCAS) modificado (COD)
302 B Ensayo Zahn-Wellens-EMPAb modificado (COD o DQO)
E. Métodos de la Unión Europea (inherente biodegradabilidad)
Ensayo SCAS modificado
Ensayo Zahn-Wellens modificado
F. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)a
ISO 9887 Ensayo SCAS
ISO 9888 Ensayo Zahn-Wellens
G. Métodos de la OCDE (simulación)
303A Tratamiento aerobio de aguas residuales (COD)
H. Métodos de la Unión Europea (simulación)
Ensayo de simulación de lodos activos (COD)
I. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)a
ISO/TC147/SC5/WG4 N140 Ensayo de simulación de lodos activos (COD)

3.6.4. Técnicas analíticas para el seguimiento de la biodegradación

Para la estimación del progreso y la extensión de la biodegradación de un tensioactivo en el sistema bajo observación, existen multitud de métodos analíticos. Estas técnicas pueden hacer uso de propiedades físicas o químicas del propio tensioactivo o de sus intermedios de biodegradación. También es posible medir funciones relacionadas tales como la cantidad de oxígeno consumido o el CO₂ producido por los microorganismos.

Cada uno de los métodos analíticos tiene ventajas para su aplicación, pero ninguno de ellos está exento de limitaciones. Muchos de estos métodos no son aplicables a concentraciones excesivamente pequeñas (0.1- 10 mg/L), concentraciones de interés en investigación ambiental y en ensayos de biodegradabilidad.

Métodos físicos o no específicos:

Se basan en la medida de alguna propiedad física del sistema que contiene al tensioactivo, tales como la formación de espuma o la disminución de la tensión superficial. Se les denomina métodos no específicos por no distinguir entre los tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos. Revelan concentración de tensioactivos en el intervalo entre 0.1 y 100 ppm.

Métodos químicos o semiespecíficos:

El principio de los métodos químicos consiste en la formación de un compuesto o complejo con el tensioactivo para extraerlo (por transferencia de fases o precipitación), seguido de una determinación colorimétrica o espectrofotométrica. El principal inconveniente que presentan estos métodos es la baja sensibilidad a los homólogos de menor cadena carbonada.

A diferencia de los métodos físicos, los químicos distinguen entre las distintas clases de tensioactivos, aniónicos, catiónicos y no iónicos, pero dentro de cada clase no se distingue al tensioactivo concreto de que se trata, por lo que también reciben el nombre de semiespecíficos.

Métodos físico-químicos o específicos:

Son las técnicas instrumentales, basadas en la aplicación de técnicas físico-químicas, permiten distinguir entre los tensioactivos de una misma clase y determinar los diversos componentes (oligómeros, homólogos, isómeros...). Las técnicas cromatográficas han resultado de gran utilidad por su selectividad, sensibilidad y versatilidad. La cromatografía líquida y gaseosa de alta resolución son actualmente las técnicas de uso más extendido en el análisis específico de tensioactivos, aunque también existen otras como espectroscopia de infrarrojos, espectroscopia ultravioleta y técnicas traza.

Métodos metabólicos y otros métodos no específicos

Algunas de estas técnicas son: DQO, DBO (técnicas de botella cerrada, respirometría), CO₂, crecimiento bacteriano y toxicidad.

Merece especial importancia la toma de muestras en los ensayos de biodegradabilidad. A causa de la capacidad de los tensioactivos de adsorberse en las superficies y sólidos en suspensión, es necesario extremar las precauciones a la hora de obtener muestras representativas para su posterior análisis. Una precaución en la toma de muestras es tomar ésta exenta de espuma así como rellenar completamente el recipiente de la muestra. En el caso de que se tomara una alícuota de la muestra, el recipiente debe someterse a una cuidadosa agitación con un agitador magnético o invertir el recipiente hasta mezclar bien el contenido.

En la mayoría de los ensayos de biodegradabilidad las muestras a analizar contienen cierta cantidad de sólidos, suspendidos o no. Si se hace necesaria la separación, es conveniente centrifugar la muestra en lugar de filtrar. Si se utilizara la filtración se aconseja rechazar los primeros 10-20 ml de filtrado obtenidos con objeto de minimizar la adsorción del tensioactivo en el material filtrante. La conservación de muestras antes de ser analizadas puede hacerse mediante la adición de mercurio, formaldehído, o mediante congelación.

A continuación se describen de forma general los principales métodos de análisis para medir biodegradación primaria para tensioactivos aniónicos y no iónicos, que son las clases de tensioactivos estudiados en este trabajo.

En el caso de los tensioactivos aniónicos, cuando se desea conocer el nivel de tensioactivos totales en aguas residuales, el método analítico oficialmente reconocido es:

- Azul de Metileno o MBAS (Sustancias activas al Azul de Metileno). Este método está basado en las modificaciones de Abbott (Abbott, 1962) del método de Longwell y Maniece (1955). Permite medir un rango de concentraciones de 0.1-2.0 mg/L para 100 ml de muestra. El límite de detección está en 0.02-0.05 mg/L. Es el método colorimétrico más usual para determinación de tensioactivos aniónicos. El tensioactivo aniónico reacciona con un colorante catiónico para formar un par iónico que se extrae bajo condiciones controladas de pH y agitación, finalmente se realiza una medida espectrofotométrica. La especificidad del método es baja: todos los sulfatos y sulfonatos utilizados en preparaciones comerciales reaccionan positivamente. El método del azul de metileno para tensioactivos aniónicos ha sido oficialmente adoptado en Europa (OECD, 1976; CEE, 1982a).
- Métodos cromatográficos: TLC (cromatografía de capa fina), GC (cromatografía gaseosa) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

En el caso de los **tensioactivos no iónicos**, los tensioactivos comerciales con un grupo etoxilado (representan el grupo más importante de tensioactivos no iónicos) no son entidades moleculares individuales, están formados por un elevado número de homólogos y oligómeros, por tanto la determinación analítica de tensioactivos no iónicos a bajas concentraciones resulta más complicada que para tensioactivos aniónicos y catiónicos en tres sentidos: los tensioactivos polietoxilados incluyen una gran variedad de sustancias químicas, las interferencias con otros materiales en muestras ambientales resultan más complicadas, los intermedios de biodegradación no se identifican tan claramente como el tensioactivo de partida. En muchas ocasiones se requiere una purificación de las muestras en muestras ambientales. Los métodos que se aplican comúnmente al análisis de estos tensioactivos son:

- Yoduro de Bismuto, BiAS o Método de Wickbold. Es el método oficial europeo (OECD, 1976; CE 648/2004) para análisis de tensioactivos no iónicos etoxilados en general, expresándose como contenido en BiAS (Sustancias activas al yoduro de bismuto).
- Cobaltotiocianato o CTAS (Crabb, 1964)
- Métodos cromatográficos: TLC (cromatografía de capa fina), GC (cromatografía gaseosa) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).
- Método propuesto por la American SDA (Matthijs, 1991).
- Método europeo normalizado para la determinación de tensioactivos no iónicos (Matthijs, 1991).
- Potasio picrato o PPAS.
- Método del yodo/yoduro (Jurado, 2002).
- Método de la Antrona (Qui, 2006)

3.6.5. Variables que influyen en la biodegradación

En un ensayo de biodegradación intervienen numerosas variables que pueden tener gran influencia en el resultado final obtenido como son: los microorganismos (tipo, aclimatación, concentración), el medio de cultivo (tipo, concentración), oxígeno, temperatura, pH, luz, la concentración del propio tensioactivo y el método analítico utilizado.

Los microorganismos que se utilizan en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad deben ser del tipo de los que realmente se encuentran en las aguas de río, agua de mar, aguas residuales y en los procesos de depuración (autodepuración y tratamiento biológico en plantas depuradoras), de esta forma los resultados que se obtengan de los ensayos pueden ser extrapolados a la realidad. Aunque son numerosos y variados los microorganismos existentes en estos medios, las bacterias forman la mayor parte de su población por desarrollarse mejor y más rápidamente que otros microorganismos.

La experiencia indica que los mejores resultados en los ensayos de biodegradación se obtienen con un inóculo polivalente de diferentes especies, ya que las poblaciones mixtas proporcionan más información para la predicción del comportamiento de un tensioactivo en un medio natural real. Las especies puras son apropiadas en los estudios de biodegradación en que se quieran aclarar los mecanismos o secuencias de reacciones de la oxidación biológica.

Además, la concentración bacteriana es un factor muy importante en los ensayos de biodegradabilidad, ya que afecta a la velocidad de degradación, al período de aclimatación, y por consiguiente al tiempo total de la degradación. Cuando la relación de bacterias a tensioactivo disminuye, el período de adaptación aumenta y la velocidad de degradación disminuye.

En los métodos de ensayo de fácil biodegradabilidad de la OCDE se hace alusión sobre los siguientes aspectos; el inóculo debe provenir del medio ambiente, la densidad celular está limitada a alrededor de 10^6 células/mL en el medio de ensayo y el pretratamiento no debe incluir una pre-exposición del inóculo al compuesto a ensayar. En los métodos revisados de la OCDE se admite un pre-acondicionamiento, lo que permite a los microorganismos aclimatarse a las condiciones del ensayo elegido.

Puesto que los tensioactivos se usan principalmente en medios acuosos, los ensayos más importantes son los que ocurren en este medio. Ya que los métodos de ensayo de biodegradabilidad suelen representar o simular en el laboratorio las condiciones naturales, se debe utilizar en los ensayos agua de río, mar o agua residual. Sin embargo, si se quieren obtener ensayos reproducibles se recomienda el uso de aguas sintéticas a base de sustancias orgánicas que suministren los elementos necesarios. En algunos casos se utilizan mezclas de

medio natural y sintético y en otros casos medios sintéticos que reproducen condiciones naturales y donde el detergente o el tensioactivo es la única fuente de sustancia orgánica, o bien va acompañado de otros nutrientes orgánicos que sirven para ayudar al normal desarrollo de los microorganismos.

Puede ocurrir que, dependiendo del tipo de compuestos y la concentración en el medio, las bacterias inicien su metabolismo a base de otro compuesto orgánico más asequible y no degraden la molécula de tensioactivo hasta que dicho compuesto haya desaparecido prácticamente, con lo que la degradación del tensioactivo se retarda de forma sensible.

Igualmente puede ocurrir que los nutrientes presentes en el medio actúen como agente bacteriostático o bactericida, e incluso comportarse como uno u otro dependiendo de las condiciones del ensayo.

La presencia de oxígeno libre en el medio es fundamental para el desarrollo de los microorganismos aerobios, que lo utilizan como agente oxidante de los sustratos orgánicos. En los métodos de ensayo y estudios de biodegradación en medio aerobio, el medio se airea por agitación o por paso de una corriente de aire, en ningún caso se introduce oxígeno puro, ya que puede afectar al desarrollo de los microorganismos por pérdidas de las pequeñas, pero necesarias, cantidades de anhídrido carbónico disuelto en el medio. Además es muy importante la relación existente entre el oxígeno disuelto disponible en el medio y el tensioactivo, ya que éste puede impedir el paso del oxígeno del aire al medio de ensayo, esto es importante sobre todo en las superficies estáticas, debido a que el tensioactivo se adsorbe en las paredes. Otro efecto importante es la adsorción del tensioactivo en las membranas exteriores celulares de los microorganismos afectando de esta forma su permeabilidad al oxígeno.

El intervalo de temperaturas dentro del cual pueden crecer y desarrollarse los microorganismos es relativamente amplio, sin embargo, para cada organismo en particular, este intervalo es pequeño. El aumento de la temperatura en los ensayos de biodegradación lleva consigo una disminución del período de latencia o tiempo de adaptación. Igualmente influye sobre la concentración limitante, pues aunque las curvas de degradación en función del tiempo sean análogas, los valores de esta concentración aumentan con la temperatura. Por lo general, se suelen usar temperaturas en los ensayos de biodegradabilidad del orden de 20-25 °C.

La mayoría de las bacterias se adaptan y desarrollan dentro de intervalos de pH relativamente amplios, sin embargo, existen algunos microorganismos cuyo desarrollo se inhibe en medios ácidos o alcalinos. Este factor no tiene importancia en los estudios de

biodegradación, ya que éstos se llevan a cabo, generalmente en medios neutros o ligeramente alcalinos, que son los más representativos de los medios naturales contaminados. Sin embargo, se observa en los métodos de ensayo de laboratorio una cierta tendencia del medio a cambiar hacia pH ácido como consecuencia de los cambios químicos debido al desarrollo de la población bacteriana. Para amortiguar los cambios excesivos de pH a veces se añaden al medio soluciones tampón.

La luz tiene una influencia apreciable para el desarrollo de los microorganismos, siendo esencial para ciertas especies de bacterias (fotosintéticas). Por lo general, en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad se recomienda la oscuridad o luz difusa.

Concentración inicial de tensioactivo

Si una sustancia es utilizada por los microorganismos como sustrato, éstos solo se desarrollan propiamente dentro de los límites específicos de concentración. A concentraciones muy bajas de sustrato, la velocidad de desarrollo es generalmente lenta, pero aumenta progresivamente a medida que se incrementa su concentración. Por encima de un cierto límite, la velocidad de crecimiento se hace constante e independiente de la concentración.

La concentración de tensioactivo en el medio de ensayo es siempre del orden de partes por millón (mg/L) y suele ser análoga, o ligeramente superior, a la concentración normal en aguas receptoras o residuales, de acuerdo con el método de ensayo empleado. En los ensayos que simulan condiciones naturales de aguas receptoras la concentración suele ser de 5 mg/L. En cualquier caso, el límite inferior de concentración vendrá dado por la sensibilidad del método analítico que se utilice y por la precisión que se desee en los resultados. La concentración máxima dependerá en cada caso del posible efecto tóxico o inhibitor del tensioactivo que pueda afectar al desarrollo de los microorganismos.

Al aumentar la concentración de tensioactivo se observa un aumento significativo del período de adaptación y una disminución de la velocidad de degradación. Este hecho puede ser debido a un efecto de interacción bacteria-tensioactivo o a una disminución de la solubilidad del oxígeno disuelto en el medio.

Existen muchos ejemplos en bibliografía en los que se muestra cómo diversos compuestos en concentraciones iniciales entre 20-100 mg/L presentan efectos inhibitorios sobre su propio proceso degradativo, pero se degradan a concentraciones más bajas.

Dobarganes (Dobarganes, 1975), realiza ensayos de biodegradación a escala de laboratorio con alquilfenoles polietoxilados, demostrándose la influencia de las variaciones de concentración del tensioactivo en los resultados de degradación obtenidos. Se comprueba la existencia de un aumento significativo del período de inducción conforme aumenta la concentración, llegándose a concentraciones de tensioactivo donde este efecto es muy pronunciado.

En los ensayos convencionales (fácil e inherente biodegradabilidad) la concentración del compuesto a ensayar debe ser lo más baja posible, siempre acorde con los límites de detección del método analítico empleado, como se ha indicado. Una orientación para compuestos inhibidores, dada por la OCDE, es que la concentración inicial (para lodo activo) debería ser de alrededor del 10% del valor de la EC50 (concentración que provoca efecto tóxico sobre el 50% de la población ensayada) cuando este valor es del orden de 300 mg/L, mientras que para compuestos más inhibidores, habría que realizar ensayos de biodegradación con un rango de concentraciones iniciales.

En cualquier caso, las condiciones del ensayo de simulación adoptadas han de ser consideradas a la hora de interpretar y extrapolar los resultados obtenidos. Según Jurado, 2007; Los resultados de este estudio demuestran que el proceso de biodegradación está relacionado con la concentración del tensioactivo inicial la CMC del tensioactivo. La concentración del tensioactivo puede ejercer un efecto inhibitorio mientras que la cantidad de tensioactivo libre presente en el medio (fuente de carbono para los microorganismos responsables de este proceso) depende de la CMC.

3.7. Toxicidad de tensioactivos

3.7.1. Introducción

Al hablar de toxicidad nos limitaremos a los efectos tóxicos causados por los tensioactivos en el medio acuático, es decir, hablamos de toxicidad acuática. Quedan por tanto al margen los posibles efectos adversos que se puedan provocar en otras áreas, como son la irritación de la piel y la ingestión accidental.

Cabe destacar que existe una gran diferencia en la realización de los ensayos de toxicidad en cuanto se refiere a llevarlos a cabo a un nivel de laboratorio o en el medio acuático real. En el primer caso, se establecen unas condiciones patrón, mientras que en el segundo caso (ecotoxicidad), ejercen una gran influencia en los resultados una serie de variables tales como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, sólidos en suspensión, etc.

La toxicidad acuática de productos tensioactivos se estudia básicamente a través de dos tipos de ensayo bien diferenciados: toxicidad aguda y toxicidad crónica.

Con el ensayo de toxicidad crónica se trata de determinar la concentración de una sustancia potencialmente tóxica, que causa algún efecto adverso durante una larga exposición a lo largo de la vida o ciclo biológico de una determinada especie. En el ensayo se observa la mortalidad producida, inhibición del crecimiento, pérdida de peso, deformaciones, efecto sobre la reproducción, etc. Los ensayos suelen realizarse sobre peces, microcrustáceos y algas.

La toxicidad aguda trata de determinar la concentración de un compuesto químico que produce un efecto adverso a corto plazo (normalmente entre 24 y 96 horas) en un grupo de organismos, tras una exposición de los mismos al compuesto que es potencialmente tóxico.

La evaluación de la toxicidad se realiza a través de las correlaciones entre sucesivas dosis del compuesto tóxico y el efecto adverso producido. Las medidas comúnmente empleadas son la EC_{50} y la LC_{50} , definidas como la concentración del producto que inactiva o causa la mortalidad, respectivamente, del 50% de los organismos con los que se ensaya.

Existe una gran gama de especies utilizadas en estos ensayos de toxicidad: alevines de peces (trucha y gripis), microcrustáceos (*Daphnia*, *Artemia*, *Gammarus*), algas (*Chlorella*, *Selenastrum*) y bacterias (*Pseudomonas*, *Photobacterium* y *Spirillum*).

La experiencia demuestra que los ensayos de toxicidad con peces son excesivamente costosos y laboriosos. Por ello, basado en las ventajas de su rapidez, sencillez y economía, se eligen como métodos de ensayo las bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* y bacterias *Pseudomona putida*.

Estos ensayos están perfectamente descritos en la bibliografía y normalizados por las normas UNE, y están ganando gran aceptación para la determinación rápida y simple de la toxicidad de compuestos químicos en aguas superficiales y residuales, así como en extractos de matrices sólidas.

La bibliografía existente en torno a la toxicidad medioambiental acuática de tensioactivos es abundante, aunque resulta difícil unificar criterios por la gran variedad de especies empleadas y por las diversas condiciones en que se realizan la mayoría de los ensayos. No obstante, en algunos trabajos publicados se recogen, en forma de tablas, datos de toxicidad de productos tensioactivos y del resto de componentes de una formulación detergente.

3.7.2. Mecanismos de toxicidad en organismos acuáticos

Los tensioactivos pueden producir efectos biológicos o influir sobre la toxicidad de los compuestos que los incluyen en sus formulaciones, lo cual puede ser llevado a cabo a través de varios mecanismos (Cserhádi, 2002; Tu & Randall, 2003):

- Reducción de la tensión superficial entre la superficie (membranas biológicas y superficie foliar) y las gotas asperjadas.
- Alteración de la permeabilidad de membranas biológicas y barreras de difusión o procesos de transporte de membrana.
- Unión a macromoléculas (péptidos, proteínas, fosfolípidos, ADN) generando un mal funcionamiento de las mismas
- Interactuando con otros componentes de la formulación.

Se ha establecido que las partes hidrofóbicas e hidrofílicas de los tensioactivos aniónicos pueden interactuar con subestructuras apolares y polares de macromoléculas tales como proteínas (Xiao, 2000; Nielsen, 2000), celulosa, almidón (Cserhádi, 2002), péptidos y ADN, al igual que insertarse en fragmento celulares como fosfolípidos de membrana generando un mal funcionamiento celular (Cserhádi, 2002) a su vez que pueden aumentar la permeabilidad de membranas biológicas hacia otros contaminantes presentes en el medio acuático. La unión de tensioactivos aniónicos a péptidos y proteínas puede alterar el plegamiento de la cadena polipeptídica y alterar la carga superficial de la molécula generando, a su vez, una modificación de su actividad biológica (Cserhádi, 2002). Los tensioactivos aniónicos influyen la actividad enzimática por unión a enzimas.

3.7.3. Relación entre estructura y toxicidad

La toxicidad es muy dependiente de la longitud de la cadena hidrocarbonada y/o etoxilada, así como de la pureza de los compuestos químicos ensayados. De forma general, la toxicidad de los tensioactivos para células y animales acuáticos aumenta con la longitud de cadena etoxilada, aunque esta tendencia puede disminuir para longitudes de cadena de 14 átomos de carbono (Sandbacka, 2000).

Kimerle (Kimerle, 1977), al estudiar la toxicidad para los homólogos del LAS encontró que la toxicidad aguda se incrementa al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada como se aprecia en la Tabla 3.4 donde se muestra la IC₅₀ para los diversos homólogos del LAS.

Tabla 3.4. Valores de IC₅₀ (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a *Daphnia magna*.

HOMOLOGO	IC ₅₀ , mg/L
Fenil C ₁₀	30-50
Fenil C ₁₁	20-30
Fenil C ₁₂	8-20
Fenil C ₁₃	5-10
Fenil C ₁₄	1-3

Siendo IC₅₀ la concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada de *Daphnia magna*.

En general, los tensioactivos aniónicos de cadena lineal suelen presentar mayor toxicidad aguda que los de cadena ramificada, si bien este efecto se ve compensado por una mayor biodegradabilidad de los primeros (Kimerle, 1977).

Para el caso específico del LAS, la toxicidad disminuye para los isómeros con el anillo aromático más lejos del extremo de la cadena alquílica, es decir, que los 2-fenilos son más tóxicos que los isómeros centrales.

La toxicidad de los tensioactivos no iónicos del tipo polietoxilados, se ve incrementada al disminuir la longitud de la cadena etoxilada.

Comparando la toxicidad de los alcoholes grasos etoxilados con la de los alquilfenoles etoxilados, estos últimos resultan menos tóxicos, si bien sus productos resultantes de la degradación (nonilfenol sin etoxilar o con bajo grado de etoxilación) parece que son un tanto

“recalcitrantes”, por cuanto su biodegradación es más lenta que la de los correspondientes homólogos de alcoholes grasos sin etoxilar con 1 ó 2 unidades de óxido de etileno.

La Tabla 3.5 muestra, para una serie de alcoholes grasos etoxilados y de nonilfenoles polietoxilados, los valores de toxicidad frente a bacterias luminiscentes y frente a la *Daphnia magna* (Ribosa, 1993)

Tabla 3.5. Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC_{50}) y frente a *Daphnia magna* (IC_{50}) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados. (Ribosa, 1993)

Unidades de OE	Alcohol graso C12-C14		NPEO	
	EC_{50} (mg/L)	IC_{50} (mg/L)	EC_{50} (mg/L)	IC_{50} (mg/L)
2	0.1	1.3	8	2.5
6	0.6	2.1	100	7.6
8	1.6	3.0	150	14.0
10	3.5	4.6	325	19.1

En términos generales se puede decir que hay una serie de criterios comunes aplicables a cualquier tipo de tensioactivo (Sánchez-Leal, 1995):

1. La toxicidad que presentan los tensioactivos en aguas limpias resulta ser mayor que en aguas contaminadas, debido a la adsorción de los tensioactivos sobre la materia orgánica en suspensión de estas últimas, con lo que se reduce la cantidad de tensioactivo en disolución
2. Los metabolitos generados en el proceso de la biodegradación resultan menos tóxicos que los productos de partida, con algunas excepciones, como el caso de los alquilfenoles etoxilados.
3. Existe una relación entre la biodegradación y la toxicidad, por cuanto los productos más tóxicos resultan ser los más fácilmente biodegradables.
4. La toxicidad de los tensioactivos se debe, fundamentalmente, a la desestructuración que producen en las membranas celulares, lo que provoca un shock osmótico y unas alteraciones de la permeabilidad de las células; por ello se explica que la mayoría de los tensioactivos resulten más tóxicos para especies de mayor organización biológica como peces que para las Daphnias.

3.8. Efectos del Ozono sobre Tensioactivos

3.8.1. Introducción

En los últimos 30 años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la aplicación de ozono para eliminar tensioactivos obteniéndose resultados muy prometedores (Delanghe y col, 1991; Gieldowska y col, 2002; Ledakowicz y Perkowski, 1997; Narkis y col, 1980; Perkowski y Col, 1994, 2000; Ungar y col, 1997)

Una de las primeras ventajas a destacar del uso del ozono es que el equipo necesario para llevar a cabo la ozonización requiere de instalaciones pequeñas y siempre se va a disponer de las materias primas para producirlo (aire, oxígeno).

Tanto tensioactivos “duros” como “blandos” se descomponen bastante, entre un 78% y un 98% (A.Gieldowska-Bulska, 2004). La velocidad de descomposición de los tensioactivos depende generalmente de:

- La concentración inicial de tensioactivo
- Su estructura química
- La dosis equivalente de ozono
- El tiempo de ozonización
- El pH
- La temperatura

Esta constatado bibliográficamente (Narkis, N y Col., 1980; 1987) que el ozono es un oxidante muy efectivo de tensioactivos, especialmente en el tratamiento de cadenas de oxietileno. Las moléculas con un alto número de grupo oxi-etilénicos se reducen, por norma general, más que en el caso de tensioactivos con cadenas cortas. (Gieldowska-Bulska y Col., 2004).

Los productos principales de la ozonización suelen ser: ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y éteres. Varios estudios (Niki y Col., 1983) mostraron que los alcoholes son oxidados a los correspondientes grupos carbonilos, que las cadenas alifáticas son funcionalizadas por la introducción de grupos hidroxilo y cetonas, y existe fragmentación a ácidos carboxílicos.

El análisis de la ozonización de alcoholes etoxilados simples mostró (Brambilla y Col, 2004) un descenso significativo de la polaridad de la disoluciones. Este fenómeno ocurre como resultado del descenso de los grupos de cadenas polietoxiladas, principalmente transformadas a ácidos carboxílicos de cadena corta. También se detectaron hidroxilo y di-hidroxilo ácidos carboxílicos, ceto-ácidos, ácidos di-carboxílicos, ácido glioxálico (formado como resultado de la

oxidación de ácido acético y/o la ruptura de las cadenas de oxietileno), di-, tri- y tetraetilenglicol, mono- y di-ácidos correspondientes a di- y tri-etilenglicoles. Las cadenas alifáticas también mostraron descomposición acompañadas de la formación de ácidos carboxílicos. En todos los casos, la velocidad de formación de estos compuestos aumenta con el incremento del pH de la disolución como resultado de verse favorecidas las reacciones radicalarias, principalmente del radical $\text{HO}\cdot$.

Cabe destacar el alto número de derivados del ozono que se producen cuando este está en disolución acuosa (Glace, 1986). Como puede verse en la figura 3.4 el ozono da lugar a un alto número radicales e iones.

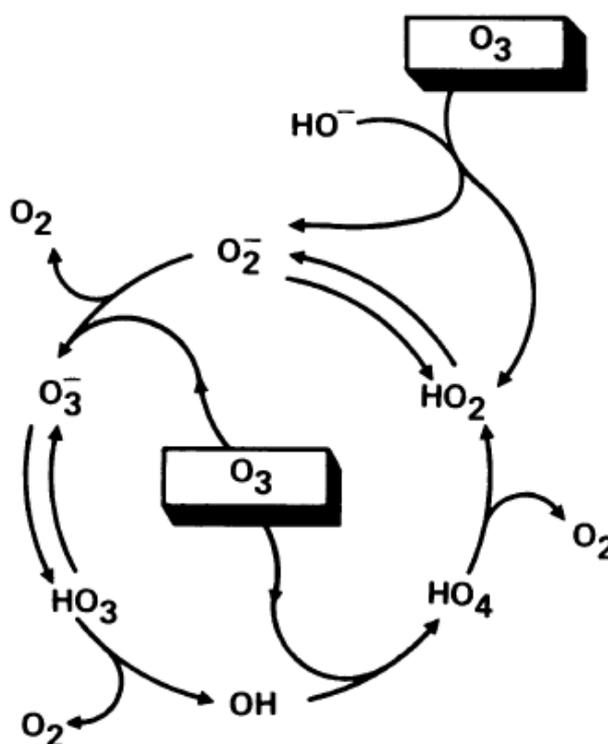


Figura 3.4 Ciclo de los mecanismos de descomposición del ozono en disolución acuosa iniciado por el ion hidroxilo. (Glace, 1986)

Ledakowicz y Col. (2005), encontraron que las cadenas polietoxiladas, responsables de las propiedades de actividad superficial son degradadas por ozono, aunque en primera instancia eran más selectivas las reacciones entre el ozono y los anillos aromáticos.

El ozono como tal (O_3) ataca los anillos aromáticos, alquenos y alquinos. Calvosa y Col., (1991) encontraron que algunos componentes de una mezcla de productos en los que estaban presentes grupos nonilo mostraron un incremento de la polaridad tras la ozonización respecto de la mezcla sin ozonizar. Esto pudo probar la evidencia de la hidroxilación de grupos

aromáticos. Sin embargo el ataque de radicales HO \cdot , incluso sobre grupos aromáticos, es más rápido (Pelizzetti y Col. 1993) que en el caso del ozono.

Ledakowicz y Col. (2005), confirmaron que existe un ataque simultáneo de las estructuras aromáticas y del resto de cadenas.

Puede decirse por tanto que el uso de ozono en disolución acuosa implica la existencia, de como mínimo, las reacciones mostradas en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Mecanismos de reacción en la ozonización: etapas de reacción y constantes cinéticas (Zao W. y Col., 2011)

Reacción	Constante cinética
$O_3 + OH^- \xrightarrow{k_1} HO_2\cdot + O_2^{\bullet-}$	$k_1 = 7.0 \times 10^1 M^{-1} s^{-1}$
$HO_2\cdot \xrightleftharpoons{K_a} O_2^{\bullet-} + H^+$	$K_a = 10^{-4.8}$
$O_3 + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{k_2} O_3^{\bullet-} + O_2$	$k_2 = 1.6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$
$O_3^{\bullet-} + H^+ \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} HO_3\cdot$	$k_3 = 5.2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ $k_{-3} = 3.3 \times 10^2 s^{-1}$
$HO_3\cdot \xrightarrow{k_4} \cdot OH + O_2$	$k_4 = 1.4 \times 10^5 s^{-1}$
$\cdot OH + O_3 \xrightarrow{k_5} HO_4\cdot$	$k_5 = 3.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$
$HO_4\cdot \xrightarrow{k_6} HO_2\cdot + O_2$	$k_6 = 2.8 \times 10^4 s^{-1}$
$HO_4\cdot + HO_4\cdot \xrightarrow{k_7} H_2O_2 + 2O_3$	$k_7 = 5.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$
$HO_4\cdot + HO_3\cdot \xrightarrow{k_8} H_2O_2 + O_3 + O_2$	$k_8 = 5.0 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$
$HO_4\cdot + HO_2\cdot \xrightarrow{k_9} H_2O + O_3 + O_2$	$k_9 = 10^{10} M^{-1} s^{-1}$
$T + zO_3 \xrightarrow{k_D} P$	$k_D = 108,810 \exp(-15,538/RT) M^{-1} s^{-1}$
$T + \cdot OH \xrightarrow{k_R} P$	$k_R = 1.7 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$
$P_i + \cdot OH \xrightarrow{k_{p_i}} \text{final or more intermediate}$	

En la ozonización de tensioactivos, se produce por lo general modificaciones estructurales a nivel molecular que provocan cambios en características fisicoquímicas de los tensioactivos, como la capacidad de espumado o la complejación con bismuto o cobaltocianato, en el caso de tensioactivos no iónicos, incrementándose su solubilidad en agua.

La ozonización de disoluciones de tensioactivo causa descensos en el TOC y COD residuales, aunque hay estudios que muestran que dichos descensos son bajos, lo que implica que el grado de mineralización de tensioactivos tras la ozonización es más bien bajo (Ledakowicz, 2005). La ozonización de disoluciones de tensioactivos, no llega por tanto a una mineralización completa hasta CO $_2$ y H $_2$ O (Narkis y Col., 1987). Puede decirse por tanto que el

tratamiento, sólo con ozono, es inadecuado para la eliminación total de tensioactivos, y en particular de tensioactivos no iónicos.

3.8.2. Técnicas analíticas para el seguimiento de la ozonización

Las técnicas cromatográficas son de gran utilidad por su selectividad, sensibilidad y versatilidad. La cromatografía líquida y gaseosa de alta resolución son actualmente las técnicas de uso más extendido en el análisis específico de tensioactivos, aunque también existen otras como espectroscopía de infrarrojos, espectroscopía ultravioleta y técnicas traza, por lo que a priori podrían ser las más adecuadas para estudiar los productos de la ozonización.

Sin embargo, dado el alto número de posibles reacciones existentes al ozonizar un tensioactivo en disolución acuosa, se requeriría un amplio trabajo previo de identificación de productos para cada familia de tensioactivos, la elección de patrones adecuados para su cuantificación y la selección del tipo de columna y condiciones de operación adecuadas. Puesto que esto requeriría un tiempo excesivo, así como de unos costes asociados a dicha investigación, en este trabajo se ha optado por no estudiar los productos de la ozonización y hacer el seguimiento de la ozonización evaluando únicamente el tensioactivo de partida.

Para evaluar las concentraciones del tensioactivo de partida utilizado, se usan los mismos métodos que para el seguimiento de la biodegradación por métodos metabólicos y otros métodos no específicos (Apartado 3.6.3):

- Método del Azul de Metileno MBAS (Jurado, 2006)
- Método del Yodo/Yoduro (Jurado, 2002)
- Método de la Antrona (Qui, 2006)

Otros factores importantes a evaluar, en el seguimiento de la ozonización son:

- El grado de mineralización de la disolución, es decir la cantidad de carbono orgánico disuelto que se elimina de la disolución por transformación en CO_2 y H_2O .
- Las modificaciones de la tensión superficial.

3.8.3. Biodegradación y toxicidad de tensioactivos tras la ozonización

La ozonización puede ser usada para transformar a los tensioactivos, sobre todo los no iónicos, en productos más biodegradables y menos tóxicos para los cultivos microbiológicos de reactores de biodegradación.

Sin embargo, hay estudios (Legube, 1989) que muestran que algunos de los productos de la ozonización de varios contaminantes orgánicos, como los tensioactivos, pueden ser incluso más tóxicos que dichos compuestos sin ozonizar.

Ledakowicz y Col. (2005), concluyeron que a pesar de las diferencias entre la estructura química de los distintos tensioactivos no-iónicos que ensayaron (Polietilenglicol 2,6,8-trimetil-4 nonanol éter, polietilenglicol nonil fenol éter, polietilenglicol cetil éter, polietilenglicol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenol-éter), su descomposición en disolución acuosa por ozono fue bastante similar encontrando que:

- Los productos de la descomposición de los tensioactivos tenían mayor toxicidad. Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular formados por la ozonización, como por ejemplo el nonilfenoles polietoxilados de cadenas cortas, varios tipos de ácidos,... presentaron mayor toxicidad sobre bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri*.
- La ozonización solo mejoró ligeramente la biodegradabilidad de las disoluciones de tensioactivos.

Sin embargo, esto no puede generalizarse, pues en función del tensioactivo de partida se obtendrán unos productos u otros. Es en este aspecto donde se centra el presente trabajo fin de master, en la relación existente entre la estructura de un tensioactivo y la evolución de la biodegradabilidad y toxicidad tras ozonizar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

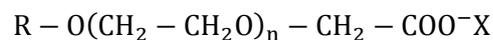
4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tensioactivos utilizados

Para llevar a cabo el presente Trabajo Fin de Master se han utilizado los siguientes tensioactivos:

Tensioactivos aniónicos:

- **Ácido alquil éter carboxílico:** EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ Suministrado por Kao Corporation S.A, cuya fórmula general es:



Se comercializa con el nombre AKYPO® RLM100 y se utiliza como tensioactivo de baja formación de espuma, y en productos que van a estar en contacto con piel y ojos ya que son poco irritantes.

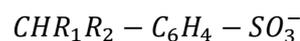
Tabla 4.1. Propiedades del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizado.

Nombre Comercial	Descripción Química	R	n	% Materia Activa	CMC, mg/L
AKYPO RLM100	Laureth-11 Carboxylic Acid	C8-C10	10	90	≈41,8

R: Longitud de cadena

n: Grado de etoxilación

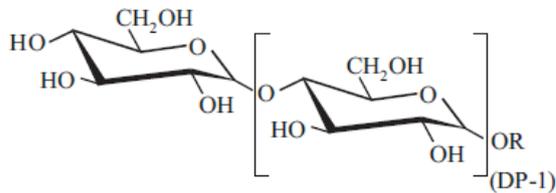
- **Alquilbenceno sulfonato lineal:** LAS-R₁₁₋₁₄, suministrado por Petresa bajo el nombre de PetreLAS550 y cuya fórmula general es:



Donde R₁ y R₂ son cadenas laterales.

Tensioactivos no-iónicos:

- **Alquilpoliglucósido (APG):** APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} Suministrado por Henkel-Cognis, cuya fórmula general es:



DP: Grado de polimerización

R: Grupo Alquil

Se comercializa bajo el nombre comercial GLUCOPONE® 600 CS UP y suele utilizarse como detergente para lavanderías y lavavajillas y en otros productos de limpieza.

Tabla 4.2. Propiedades del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizado.

Nombre Comercial	R	DP	PM _{medio} ⁽²⁾	CMC, mg/L	HLB ⁽³⁾	%Humedad ⁽²⁾
GLUCOPONE® 600 CS UP	C12-C14	1,59	386		12,7	46,6

R: Longitud de cadena

DP: Grado de polimerización

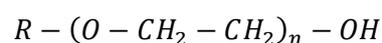
CMC: Concentración micelar crítica

HLB: Balance hidrófilo-lipófilo

⁽²⁾: Bravo (2005)

⁽³⁾: Datos obtenidos por Altmajer (2004)

- **Alcoholes grasos etoxilados (AGE):** FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ Suministrado por Kao-Corporation.S.A, de fórmula general:



Este tipo de tensioactivo se comercializa como FINDET® 1214N-23, y se utiliza en limpiadores de superficies duras, limpiadores para suelos, desengrasante y en detergentes pesados líquidos y en polvo.

Tabla 4.3. Propiedades del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizado.

Nombre Comercial	Descripción Química	R	n	HLB ⁽⁵⁾	CMC, mg/L
FINDET [®] 1214N-23	Laureth-11 + Myreth-11	C12 - 70% C14 - 30%	11	14,3	≈88

R: Longitud de cadena carbonada

n: n^o de unidades de óxido de etileno

CMC: Concentración micelar crítica

HLB: Balance hidrófilo-lipófilo

⁽⁵⁾: Jurado (2007)

4.2. Procedimiento para la ozonización

Se han utilizado dos formas de ozonización sin variaciones en el fundamento, variando únicamente el montaje experimental ligeramente para permitir ozonizar las cantidades necesarias de disoluciones de tensioactivos en función del tipo de ensayo que se vaya a realizar:

- Ensayos de biodegradación
- Resto de ensayos

4.2.1. Fundamento

El procedimiento para ozonizar se basa en hacer burbujear una corriente gaseosa de oxígeno y ozono sobre un recipiente adecuado y agitado que contiene una disolución en la que están presentes los tensioactivos objetos de ensayo.

4.2.2. Equipos

Los equipos utilizados han sido:

- Generador de ozono de Anseros modelo COM-AD-01 (Anseros GmbH, Tübingen, Alemania)
- Analizador de ozono de Anseros modelo Ozomat GM-6000
- Baño termostático de P.Selecta modelo Ultraterm
- Campana de extracción de gases con detector de ozono de ROMERO modelo Flowtronic
- Caudalímetro de gases

4.2.2.1. Montaje experimental para ensayos de biodegradación

Puesto que el ensayo de biodegradación requiere una cantidad de 1.200 mL de la disolución de tensioactivo, se utiliza un matraz Erlenmeyer de 2.000 mL sobre el que, una vez añadidas todas las soluciones del ensayo de biodegradación, el tensioactivo a ensayar y previo a la adición del inóculo de bacterias mixtas, se ozoniza.

En la figura 4.1 se muestra un esquema del sistema utilizado para la ozonización en este tipo de ensayos.

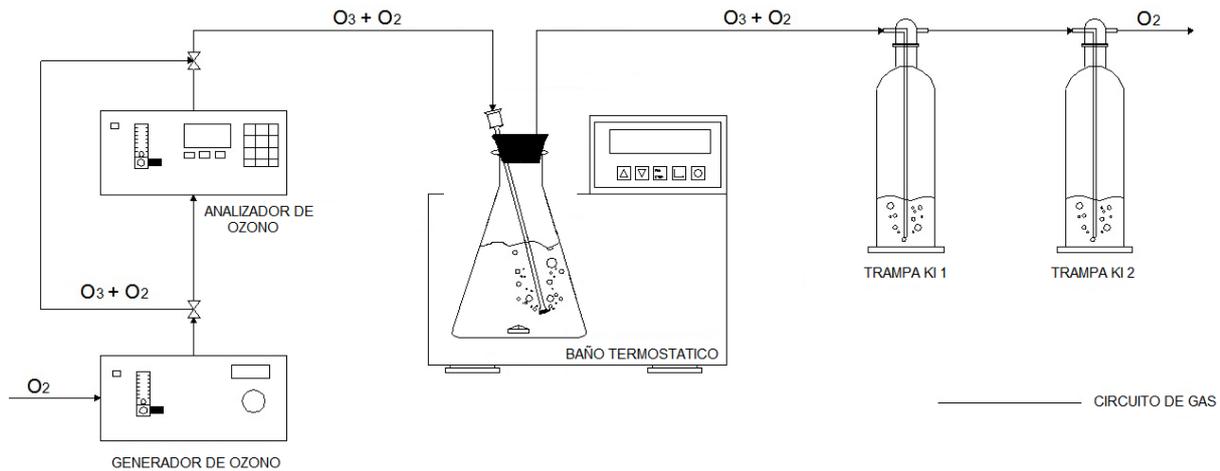


Figura 4.1. Esquema de ozonización para los ensayos estáticos de biodegradación

Procedimiento

1. Previo uso, todo el material se limpia siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de limpieza.
2. Poner en marcha el sistema de termostatizado a la temperatura de ensayo.
3. Preparar el ensayo de biodegradación estático tal como se describe en el apartado 4.5.1 sin adicionar el inculo de bacterias sobre un Erlenmeyer de 2L.
4. Colocar el imán en el Erlenmeyer y activar la agitación.
5. Rellenar las trampas con 200mL de disolución al 5% en peso de KI
6. Activar el sistema de extracción de gases de la campana
7. Abrir el flujo de oxígeno al sistema y fijar el caudal de ensayo
8. Encender el analizador y el generador de ozono asegurándose de que esta desactivada la producción de ozono.
9. Una vez operativo el analizador de ozono, y asegurándonos de que la sonda difusora de ozono esta fuera del Erlenmeyer, fijar y activar la producción de ozono a la concentración deseada.
10. Cuando la concentración de ozono este estabilizada en el valor deseado introducir la sonda de burbujeo, fijada sobre el tapón, en el Erlenmeyer; activar el cronometro y ozonizar el tiempo deseado
11. Tras la ozonización se podrá proseguir con el inculo de bacterias para el ensayo de biodegradación estático

PRECAUCIÓN: El ozono es muy tóxico, siempre que se acceda al interior de la campana de gases y sobre todo al finalizar la ozonización y quitar el tapón del Erlenmeyer, se deberá usar una mascara de gases de conformidad con la Norma Europea 405:2001.

4.2.2.2. Montaje experimental para el resto de ensayos

Por lo general este es el sistema de ozonización que se utiliza para ensayos de ozonizado.

En la figura 4.2 se muestra un esquema del sistema utilizado para la ozonización en este tipo de ensayos.

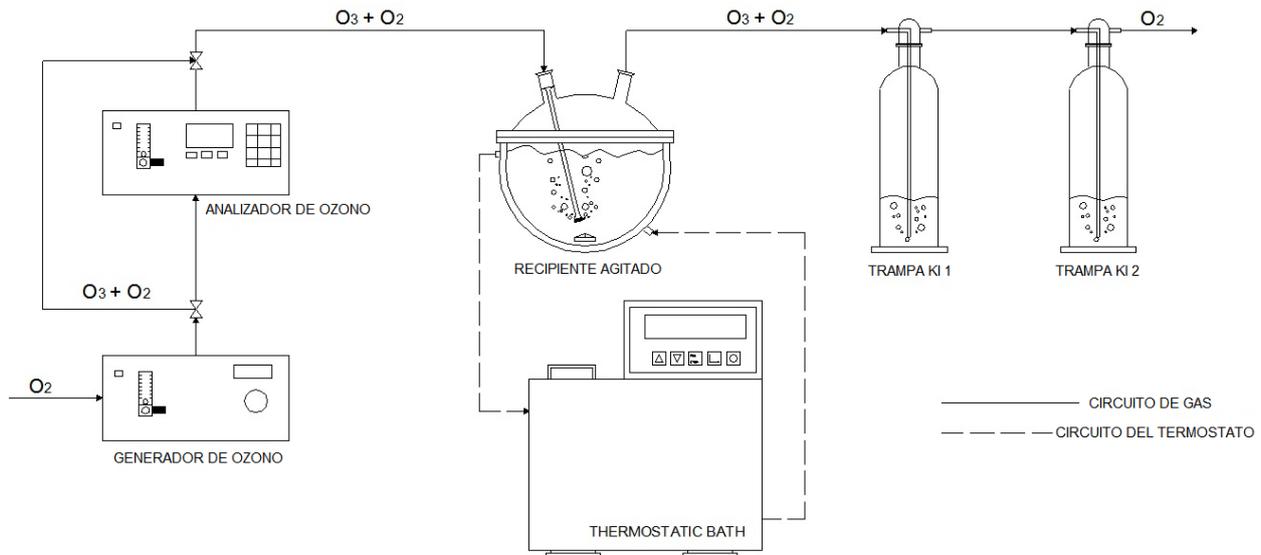


Figura 4.2. Esquema de ozonización general para muestras de tensioactivo.

Procedimiento

A continuación se describen los pasos realizados para ozonizar:

1. Previo uso, todo el reactor se limpia siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de limpieza.
2. Poner en marcha el sistema de termostato a la temperatura de ensayo.
3. Colocar el imán en el reactor, 200mL de la disolución a ozonizar y poner la tapa del reactor.
4. Rellenar las trampas con 200mL de disolución al 5% en peso de KI
5. Activar el sistema de extracción de gases de la campana
6. Abrir el flujo de oxígeno al sistema y fijar el caudal de ensayo
7. Encender el analizador y el generador de ozono asegurándose de que esta desactivada la producción de ozono.
8. Una vez operativo el analizador de ozono, y asegurándonos de que la sonda difusora de ozono esta fuera del reactor, fijar y activar la producción de ozono a la concentración deseada.

9. Cuando la concentración de ozono este estabilizada en el valor deseado introducir la sonda de burbujeo en el reactor, activar el cronometro y comenzar la toma de muestras cuando corresponda.

Manipulación de muestras

- Las muestras extraídas del reactor se vierten sobre viales de vidrio, cualquier vial de materiales plásticos sufrirá el ataque del ozono y sus derivados.
- Si las muestras no van a ser analizadas *in situ*, se congelan.

4.3. Métodos de análisis

4.3.1. Análisis de tensioactivos

4.3.1.1. Método simplificado de análisis para determinación de sustancias activas al azul de metileno

Para la medida de la concentración de tensioactivos aniónicos se ha tomado la simplificación propuesta por Lechuga, 2005 del método que se describe en la NORMA UNE EN 903: "Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM". (Jurado E., 2002)

Fundamento del método

Se basa en la formación de sales coloreadas del tensioactivo aniónico, en medio alcalino, con azul de metileno (colorante catiónico). Estas sales se extraen con cloroformo y se hace un tratamiento ácido de la disolución clorofórmica. Se eliminan las interferencias por extracción del complejo "sustancia aniónica-azul de metileno" contenido en la disolución alcalina, posteriormente se agita el extracto en presencia de una disolución acididad de azul de metileno y se mide espectrofotométricamente la absorbancia de la fase orgánica.

Reactivos y Disoluciones

- *Cloroformo* (CHCl_3 , P.A. de Panreac)
- *Disolución de azul de Metileno*, estabilizada a pH ligeramente ácido; se disuelven 0,1 g de azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, P.A. de Panreac) en 100 mL de la disolución tampón bórax 10 mM y pH 5-6. Esta disolución se guarda en un frasco color topacio.
- *Disolución madre patrón de tensioactivo*; se prepara a 1 g/L Y pH neutro.
- *Disolución patrón de tensioactivo de 10 mg/L* preparada por dilución 1:100 de la disolución madre patrón.
- *Solución tampón de tetraborato sódico* ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, P.A. de Panreac) 50 mM y pH 10,5

Procedimiento

En viales de vidrio para medidas espectrofotométricas de 10 mL de capacidad, se adicionan 5mL de muestra, y se alcaliniza hasta pH 10 mediante la adición de 200 μ L de tetraborato sódico 50mM y pH 10,5, a continuación se añaden 100 μ L de azul de metileno de 1 g/L estabilizado. Finalmente se adicionan 4 ml de cloroformo, y tras agitar, se esperan 5 minutos antes de medir la absorbancia a 650nm frente a aire o frente a un blanco con cloroformo.

A título de ejemplo se muestra una recta de calibrado para el tensioactivo aniónico LAS-R₁₁₋₁₄ utilizado (figura 4.3).

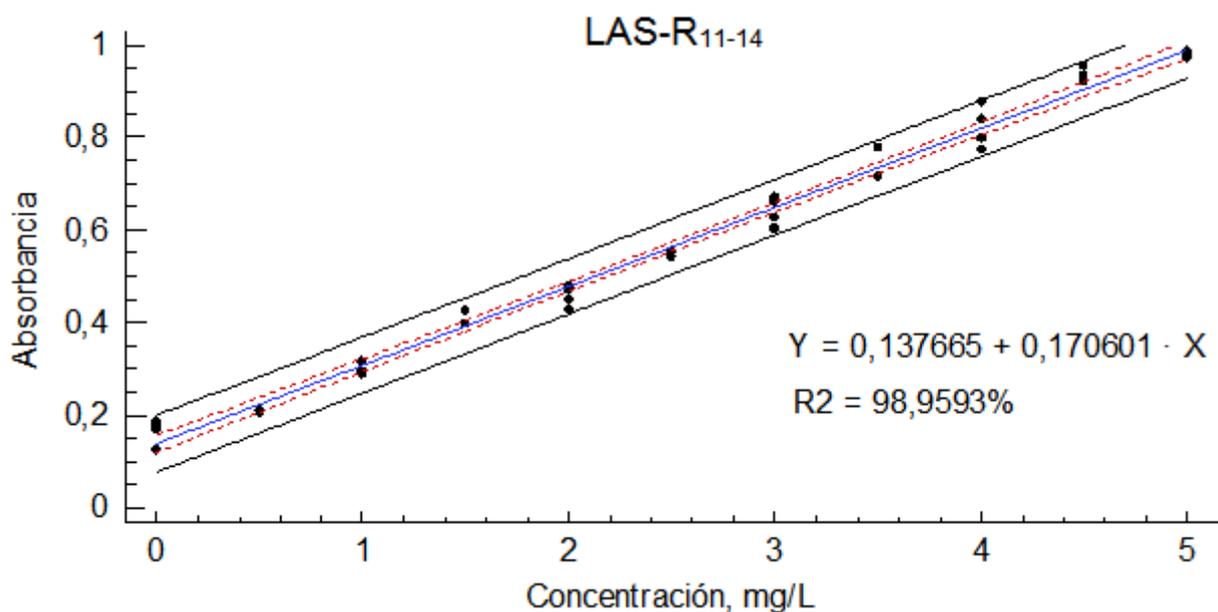


Figura 4.3.- Recta de calibrado para el LAS según el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno.

4.3.1.2. Método del carbono orgánico total (COD)

La determinación del COD, se ha utilizado para llevar a cabo el seguimiento de la biodegradabilidad durante el ensayo estático y para determinar el grado de mineralización de los tensioactivos a distintos tiempos y condiciones de ozonización. Los resultados de carbono orgánico disuelto servirán para determinar la concentración residual de tensioactivo que queda en los ensayos estáticos y observar cómo se biodegrada con el tiempo.

Fundamento del método

La medida se realiza con un equipo específico, "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu.

El método que usa el equipo TOC-V CSH para el análisis es el de combustión oxidativa, es un método extensamente usado y recomendado por los estándares analíticos internacionales. El principio de medida de este aparato consiste en determinar en primer lugar el contenido en carbono total (TC), para seguidamente determinar el contenido de carbono inorgánico (IC), de modo que por diferencia se obtiene el valor del carbono orgánico total.

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

En el caso de que la muestra sea filtrada para eliminar sólidos en suspensión, hablaremos de Carbono orgánico disuelto **COD**, el cual será de referencia en la mayoría de los análisis realizados.

Para la determinación del carbono total el equipo cuenta con un reactor de combustión tubular relleno de catalizador (cobre-platino) y calentado a 680°C. A este reactor se le aplica de forma continua un gas portador (aire sintético de alta pureza) a un flujo controlado de 150 mL/min. Cuando la muestra es introducida mediante un inyector automático al reactor de combustión, todo el carbono presente en la muestra es transformado en CO₂. El gas portador, que contiene los productos de combustión del reactor, pasa por unos sistemas de humidificación y enfriamiento, un scrubber de halógenos, y finalmente pasa por una celda localizada en el interior de un analizador de gases por infrarrojo no dispersivo (NDIR) donde el CO₂ es detectado. El NDIR emite una señal de detección (analógica) en forma de pico, cuya área es calculada por un procesador de datos, siendo ésta proporcional a la cantidad de TC presente en la muestra.

El carbono inorgánico es determinado mediante un reactor IC en el que el gas portador se encuentra fluyendo continuamente en forma de pequeñas burbujas en el seno de una solución de ácido fosfórico al 25%. Al inyectar la muestra en el reactor, todo el carbono presente en la misma en forma de CO₂ disuelto, carbonato o bicarbonato, es transformado en

CO₂ gaseoso que es arrastrado y detectado por el NDIR del mismo modo descrito anteriormente para el TC.

A continuación se muestra un diagrama de flujo del funcionamiento del equipo.

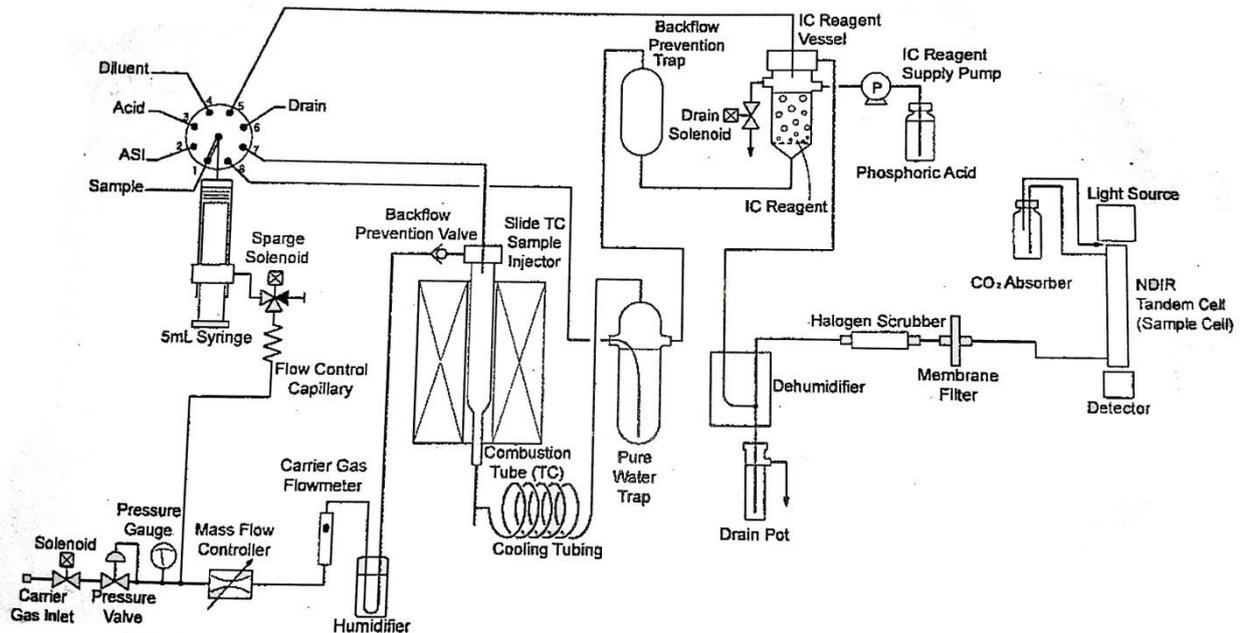


Figura 4.4. Diagrama de flujo del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu.

Reactivos

Durante todo el análisis se utilizan reactivos de calidad analítica reconocida, y agua desionizada.

- Ácido Clorhídrico. Utilizado para obtener un pH inferior a 3 durante el análisis del IC.
- Ácido fosfórico
- Hidróxido sódico. Utilizado como absorbedor del CO₂
- Agua desionizada. Utilizada por el equipo para las diluciones programadas y para la limpieza y lavado del mismo.
- Disolución patrón 1000 ppm IC, se disuelven 3.5 g de bicarbonato sódico y 4.41 g de carbonato sódico en 1 L de agua.
- Disolución patrón 1000 ppm TC, se disuelven 2.125 g de biftalato potásico en 1L de agua.

*Equipos*Medidor de TOC

Equipo para la determinación del Carbono Orgánico Total (TOC), carbono inorgánico (IC) y carbono total (TC) "TOC-V CSH" equipado con un automuestreador y viales específicos, de la casa Shimadzu y con las siguientes especificaciones.

Tabla 4.4. Especificaciones Técnicas TOC-V CSH

TOC	
Modelo TOC	V CSH
Método de medida	Combustión oxidativa catalítica/celda de infrarrojos no dispersiva
Funcionamiento	Independiente o controlado por PC
Tipo de muestras	Líquidas (opcional sólido/gas)
Tipo de medidas	Carbono inorgánico, carbono orgánico total, carbono total
Límite de detección	50µg/L
Gama de Medición	0-3000 mg/L
Presión	CV 1.5% máx.
Tiempo de medida TC	3 min
Tiempo de medida IC	3 min
Tipo de Inyección	Inyección automática
Volumen de inyección	10-2000 µL
Pretratamiento IC	Tratamiento y rociado automático
Dilución de la muestra	Automática de 2 a 50 veces
Gas de transporte	Aire de alta pureza
Presión del Gas	300-600 kPa
Rango de Temperatura ambiente	5-35°C
Alimentación eléctrica	AC 100-127 ± 10%, Max. 800 VA AC 220-240 ± 10%, Max. 1200 VA
Dimensiones	(W)440x(D)560x(H)450 mm
Peso	40 kg aprox.

Tabla 4.4. (Continuación) Especificaciones Técnicas TOC-V CSH

AUTOMUESTREADOR	
Peso	14 kg aprox.
Tipo de viales	24 mL
Nº de viales	93
dimensiones	(W)370x(D)540x(H)490 mm

A continuación se muestra un gráfico de la visión interior del equipo:

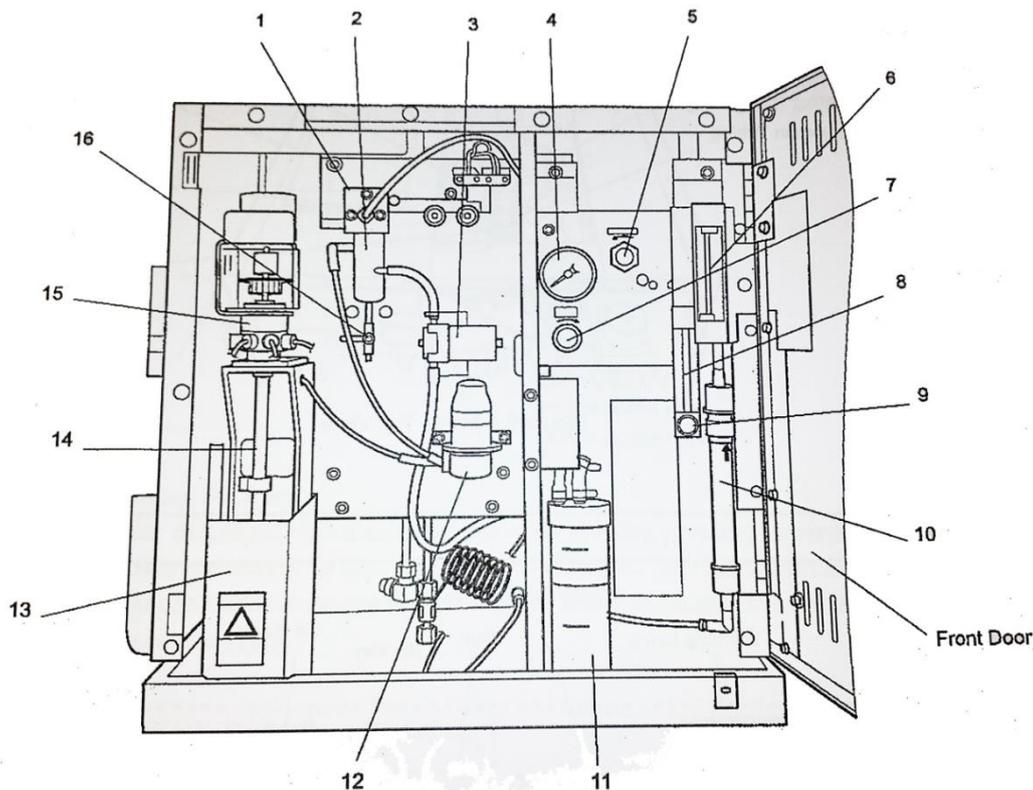


Figura 4.5. Vista interior del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu

- | | |
|---|--|
| 1. Inyector deslizante de la muestra | 9. Perilla de ajuste del flujo del gas de purga |
| 2. Recipiente del reactivo de IC | 10. Depurador de halógeno |
| 3. Válvula de solenoide | 11. Humidificador |
| 4. Medidor de presión del gas portador | 12. Bomba (para el suministro de reactivo de IC) |
| 5. Control del flujo del gas portador | 13. Cubierta de la bomba de jeringuilla |
| 6. Medidor del flujo del gas portador | 14. Jeringuilla de 5mL |
| 7. Mando de ajuste de la presión del gas portador | 15. Válvula de 8 puertos |
| 8. Medidor del flujo del gas de purga | 16. Válvula de 3 puertos |

Procedimiento

Calibración y puesta en funcionamiento del TOC:

Para la obtención de los valores de TOC en mg/L se precisa determinar previamente los valores de TC e IC en mg/L. Para ello se han de transformar los datos de área del detector NDIR en unidades de concentración con la ayuda de las correspondientes rectas de calibrado.

Para obtener las rectas de calibrado se emplean disoluciones patrón TC e IC, y se realizan rectas de calibrado a altas y bajas concentraciones. En función de la concentración de la muestra, el equipo utilizará una u otra para obtener el dato del TOC.

Preparación de las muestras:

Las muestras que son extraídas del ensayo estático al principio, final y durante su desarrollo, son analizadas para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) presente en ellas.

Las muestras previamente han de ser filtradas para eliminar los restos de materia con contenido en carbono que puedan influir en la determinación del COD, como las bacterias presentes en el inóculo. Se utilizan filtros Millipore White Halg de 0.45 μm y 24 mm de diámetro. Estos filtros se colocan en el interior de la unidad de filtración y mediante una jeringa se aplica la muestra a filtrar. La muestra ya filtrada se recoge en un vial específico y se cubre con una tapadera perforable por la aguja del automuestreador del "TOC-V CSH".

Medida y toma de datos:

Una vez que se disponen de todas las muestras a analizar se colocan en el automuestreador y se programa la aplicación informática del "TOC-V CSH" para que realice las medidas oportunas de forma automática.

Finalizadas las mediciones se obtienen los datos requeridos de TOC, IC o TC, proporcionados por el equipo. Habrá que tener en cuenta, que puesto que las muestras se han filtrado, el valor del carbono orgánico total (TOC) que reporta el equipo se corresponde con el valor del carbono orgánico disuelto (COD), pues cualquier fracción de carbono orgánico no disuelto (sólidos orgánicos en suspensión) ha sido eliminada durante la etapa de filtración.

4.3.1.3. Método de análisis de la ANTRONA para APG's

Fundamento del Método

Se trata de un procedimiento adaptado de un método de análisis de carbohidratos. La antrona forma productos coloreados de color verde cuando se calienta conjuntamente con los carbohidratos en una solución ácida. Bajo esas condiciones los APG (Alquil Poliglucósidos) son hidrolizados a alcoholes grasos y carbohidratos, por tanto los APG pueden ser determinados por el mismo método. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de tensioactivo no iónico.

Reactivos y Disoluciones

- Solución de Antrona: Se disuelven 1,4758g de Reactivo de Antrona calidad P.A de Panreac sobre 100mL de Ácido Sulfúrico concentrado de calidad P.A de Panreac
- Disolución madre de 100 mg/L del APG a determinar.

Procedimiento (Método Modificado (Qui, 2006))

En viales de vidrio para medidas espectrofotométricas de 10 mL de capacidad, se adicionan 2mL de muestra de APG, a continuación se añaden 5 mL de solución de antrona. La mezcla se hidroliza durante 5 minutos a 100°C y entonces se enfría rápidamente en agua fría durante 10 minutos. La absorbancia de la mezcla se determina espectrofotométricamente a 622nm frente a un blanco con agua destilada o similar a la utilizada en las muestras.

La recta de calibración se puede utilizar al menos durante 6 meses siempre y cuando se mantengan constantes las condiciones experimentales, especialmente el tiempo de calentamiento.

A título de ejemplo se muestra una recta de calibrado para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1,5}:

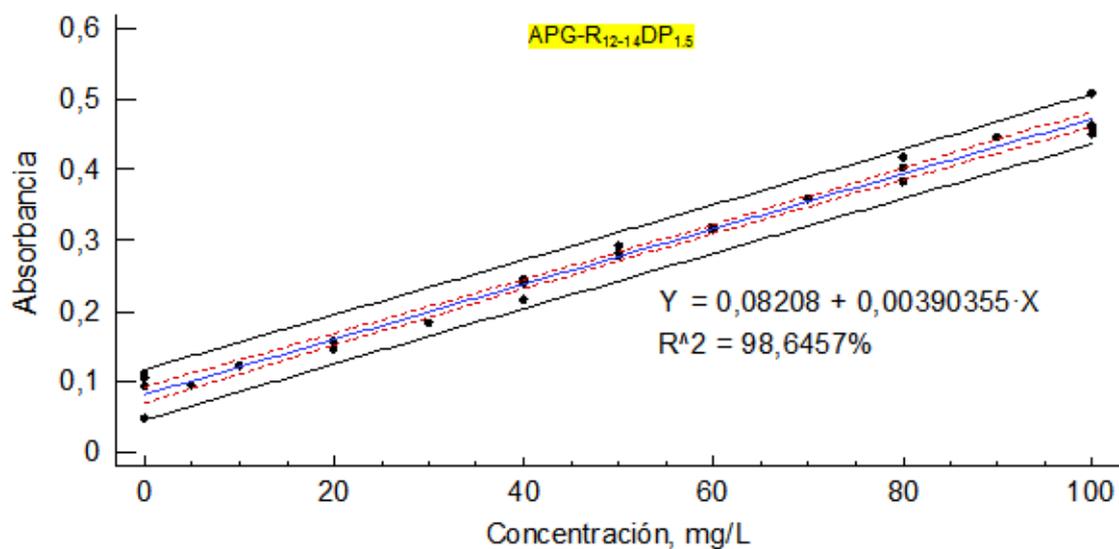


Figura 4.6.- Recta de calibrado para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1,5} por el método de la Antrona.

4.3.1.4. Método de análisis del Yodo-Yoduro para tensioactivos no iónicos

Se trata de un método semi-específico para tensioactivos no iónicos (Jurado 2002), ya que dentro de esta clase de tensioactivos el método no distingue al tensioactivo concreto de que se trata.

Fundamento del método

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el tensioactivo no iónico y el reactivo yodo-yoduro. Este complejo coloreado se determina espectrofotométricamente. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de tensioactivo no iónico.

Reactivos y disoluciones

Durante todo el análisis se utilizan reactivos de calidad analítica reconocida, y agua destilada, o de pureza equivalente.

- Reactivo yodo-yoduro: se disuelve 1 g de yodo (calidad Q.P. de Panreac) y 2 g de yoduro potásico (KI, calidad P.A. de Panreac) en 100 ml de agua. Esta solución debe conservarse en frasco de vidrio color topacio y se renueva cada 8 días.
- Solución madre patrón de tensioactivo no iónico de 1 g/L.
- Solución hija patrón de tensioactivo no iónico de 20 mg/L preparada por dilución 1/50 de la solución madre patrón.

Equipos

Espectrofotómetro

Para la medida de la absorbancia se utiliza el espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible de la casa comercial Varian, que permite realizar las medidas a 500 nm de longitud de onda.

Procedimiento

Se añaden 0.25 ml de reactivo yodo-yoduro sobre 10 ml de la muestra problema, se agita y se mantiene durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se mide la absorbancia frente al aire a 500 nm en un espectrofotómetro.

La evaluación de los resultados se realiza por medio de una recta de calibrado, para cada una de las medidas de la muestra, que da directamente el contenido de tensioactivo no

iónico expresado en mg/L. La curva de calibrado debe prepararse con el tensioactivo no iónico de que se trate en cada caso, puesto que es diferente para cada uno.

En la Figura 4.7 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁.

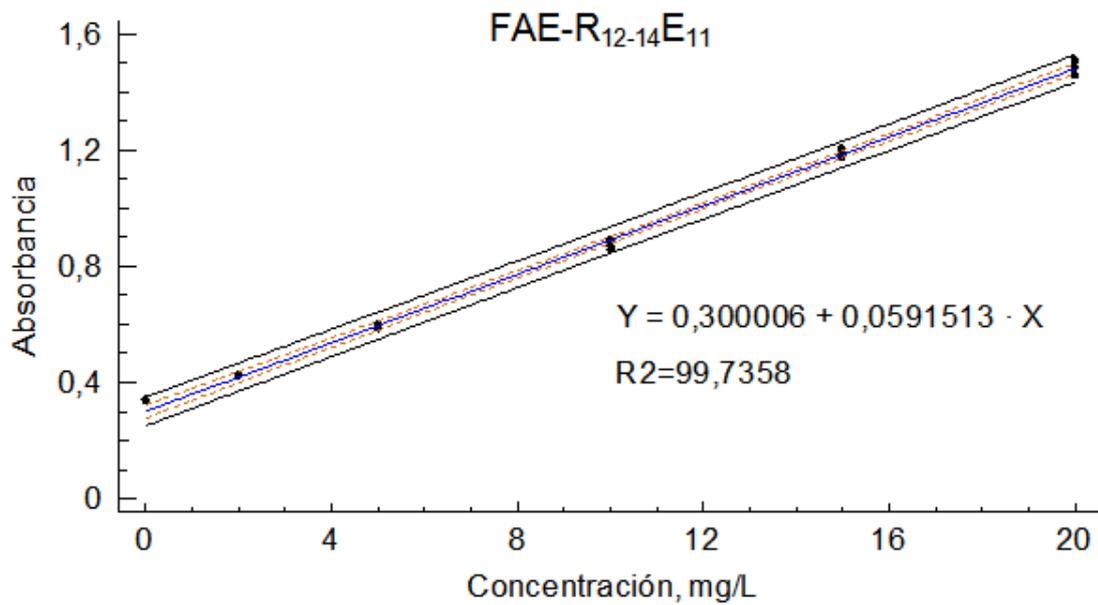


Figura 4.7. Recta de calibrado para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ por el método colorimétrico del yodo-yoduro

4.4. Determinación de los parámetros de calidad de un método analítico

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos (Cuadros, 2002). Es decir, validar implica demostrar la validez del método para el uso específico al que se destine.

La validación implica por tanto una comprobación de la exactitud de los resultados que genera el método de análisis en sus dos componentes (comprobación de la veracidad y estimación de la precisión), a través del establecimiento de los parámetros de calidad.

Para comprobar la bondad del método analítico empleado, se determinan los parámetros de calidad utilizando el modelo de cálculo propuesto por Cuadros y col. (Cuadros 1993, 1996), que se basan en la utilización del conjunto de datos obtenidos en un experimento de calibración como son:

Linealidad:

Es la ausencia de curvatura de la línea de calibración. Tradicionalmente se ha venido midiendo a partir de los coeficientes de correlación (r) y el coeficiente de determinación (R^2). Valores próximos a 1 indican una alta calidad de los datos analíticos.

La linealidad puede ser cuantificada a partir de la expresión:

$$LIN(\%) = \left(1 - \frac{S_m}{m}\right) \cdot 100 \quad [4.1]$$

Donde S_m/m es la desviación estándar relativa a la pendiente.

Sensibilidad:

Hay dos formas de expresar la sensibilidad de un método analítico: la sensibilidad de calibración, que mide la relación entre la señal instrumental y la concentración de analito; y la sensibilidad analítica, que es la menor diferencia de concentración que un método analítico puede discernir. La primera se evalúa a partir de la pendiente de calibración, m ; y la segunda a partir de cociente S_r/m , donde S_r es la desviación estándar de regresión.

Precisión:

La precisión mide el grado de incertidumbre de un resultado analítico. Esta es debida a la dispersión de la señal del instrumento y al uso de valores de la pendiente y la ordenada en el origen estimadas de la recta de calibración para transformar la señal instrumental medida en concentración. Matemáticamente se expresa por la desviación estándar relativa de la concentración, S_c/c y tiene un valor distinto a cada concentración.

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC):

El límite de detección es la menor concentración que puede detectarse con razonable certeza por un procedimiento analítico determinado. Es la concentración de analito que da una señal, y , igual a la del blanco, y_0 , más tres veces la desviación estándar del blanco, S_b :

$$y = y_0 + 3 \cdot S_b \quad [4.2]$$

El límite de cuantificación se define como la menor concentración de analito que puede ser determinada con aceptable exactitud. Se calcula de la forma descrita en la Ecuación 4.2, pero sustituyendo el 3 por 10.

En los métodos separativos, el error se evalúa a partir del rendimiento (R_a) de la separación, que se define como la relación entre la cantidad, a , separada y la cantidad inicial de a , a_0 .

$$R_a = \frac{a}{a_0} \quad [4.3]$$

4.4. Determinación de la toxicidad

La determinación de la toxicidad se ha realizado mediante los ensayos:

- LUMIStox, conforme a la NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2), utilizando bacterias marinas luminiscentes *Vibrio Fischeri* NRRL-B-11177 como microorganismos de prueba.
- De inhibición del crecimiento de *Pseudomonas Putida*, conforme a la NORMA UNE-EN ISO 10712 (UNE-EN ISO 10712), utilizando bacterias *Pseudomonas Putida* CECT 324 como microorganismos de prueba, obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo.

4.4.1. Ensayo de toxicidad LUMIStox

La medida de la toxicidad mediante el ensayo LUMIStox, se ha realizado conforme a la NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2), utilizando bacterias marinas luminiscentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 como microorganismos de prueba.

4.4.1.1. Fundamento

La medida de toxicidad se basa en la inhibición de la intensidad luminosa de la bacteria marina de la cepa *Vibrio fischeri* después de un determinado tiempo de exposición con la sustancia tóxica y en comparación con un control no tóxico.

4.4.1.2. Reactivos y disoluciones

- Bacterias luminiscentes secadas en líquido de la cepa *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 de DrLANGE. Deben almacenarse en congelador a -18 °C/-20 °C.
- Solución de reactivación; glucosa/cloruro sódico tamponado a pH 7 de DrLANGE.
- Solución de NaCl al 2 %.
- Cloruro sódico (NaCl, P.A. de Panreac).

4.4.1.3. Equipos

LUMIStox

Equipo de medición, unidad de medida y análisis para el test de bacterias luminosas en los ensayos de toxicidad conforme a DIN/EN/ISO 11348-2 (UNE EN ISO 11348-2).

Se utilizó el equipo LUMISTox 300 de DR. LANGE y cubetas de vidrio (LZP 187) de DrLANGE.

Unidad de incubación

Bloque termostatzado a 15 °C para mantener a temperatura constante las muestras utilizadas en el LUMISTox 300, cumple con la NORMA internacional ISO DIN 11348 (UNE EN ISO 11348-2).

4.4.1.4. Procedimiento

Reactivación de las bacterias luminiscentes

En primer lugar se descongela la solución de reactivación en un vaso de precipitado con agua, se agita con energía y una vez descongelada se mantiene a 15 °C en la unidad de incubación durante 15 min. A continuación se sacan las bacterias del congelador y se agita suavemente el vial durante 2 min en un vaso de precipitado con agua a $T < 25$ °C.

Se añaden 0.5 ml de la solución de reactivación al vial de bacterias y se agita suavemente hasta formar una suspensión. Se mantiene el vial en la unidad de incubación durante 15 min. Se mezclan las bacterias en suspensión con el resto de la solución de reactivación y se homogeneiza suavemente. Una vez homogeneizado se añaden 0.5 ml de dicha solución a las cubetas vacías del incubador y se termostatiza durante 15 minutos.

Las bacterias comienzan a emitir luz inmediatamente después de su reconstitución y están listas para su utilización en el ensayo, además las bacterias reactivadas deben utilizarse en un plazo inferior a 4 horas.

Preparación de la muestra y de la serie de dilución

En primer lugar se añaden a la muestra 0.3 g NaCl en forma sólida por cada 15 ml de agua. Se introducen 3 ml de muestra en la cubeta correspondiente del incubador. El pH de la muestra debe ser de 7 ± 0.2 de acuerdo con la normativa, si el pH es inferior a 6.0 o superior a 8.0, se puede producir una inhibición de la luz relacionada con el pH, en este caso se ajusta el pH añadiendo HCl o NaOH. Si las muestras presentan turbidez se filtran o centrifugan antes de realizar el ensayo.

Para la serie de dilución se introducen 1.5 ml de la solución de NaCl al 2% en las cubetas correspondientes y se van transfiriendo 1.5 ml desde la cubeta que contiene la muestra hasta la cubeta en penúltima posición.

Medida

En primer lugar se prepara el LUMISTox, para ello se selecciona el modo de medición EC, la prueba 480 y se cambian los valores de la concentración de la muestra si es necesario.

A continuación se mide la intensidad luminosa a tiempo cero y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos respectivamente. Todas las medidas se realizan por duplicado.

El tiempo de contacto de la suspensión de ensayo con las bacterias luminiscentes debe ser el mismo para todas las muestras de la serie de dilución, para ello debe transcurrir el mismo intervalo de tiempo entre adiciones sucesivas, que suele ser de 20 segundos.

4.4.1.5. Evaluación

Efecto Inhibidor sobre las bacterias luminiscentes

Los valores iniciales de intensidad luminosa, medidos para todas las muestras de ensayo, se corrigen mediante un factor que tiene en cuenta la disminución de intensidad luminosa que se produce de forma natural, aún en ausencia de muestra tóxica.

$$f_k = \frac{I_t(0)}{I_o(0)} \quad [4.4]$$

Donde:

- f_k : factor de corrección para el tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.
- $I_o(0)$: intensidad luminosa a tiempo cero, antes de la adición de la suspensión de bacterias.
- $I_t(0)$: intensidad luminosa tras un tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.

La intensidad luminosa se expresa en unidades de luminiscencia relativa.

El efecto inhibidor de la muestra de ensayo para un tiempo de incubación t , se calcula mediante la expresión:

$$H_t = \frac{I_{0t}(c) - I_t(c)}{I_{0t}(c)} \cdot 100 \quad [4.5]$$

Donde:

$$I_{0t}(c) = \bar{f}_k \cdot I_0(c) \quad [4.6]$$

Siendo \bar{f}_k el factor de corrección promedio de las muestras de control.

Para la evaluación de las relaciones concentración/efecto, se calcula para cada nivel de dilución la función Gamma. Esta función Gamma es la razón entre la intensidad de luz perdida por la solución de bacterias y la que queda después de que éstas han sido expuestas a la acción de una muestra tóxica, y se puede evaluar por la ecuación:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} = \frac{\bar{f}_k \cdot I_0(c) - I_t(0)}{I_t(c)} \quad [4.7]$$

Siendo:

- $I_0(0)$ y $I_t(0)$: lecturas de intensidad luminosa de la cubeta que contiene concentración 0 a tiempo 0 y t.
- $I_0(c)$ e $I_t(c)$: lecturas de intensidad luminosa en la cubeta que contiene concentración c a tiempo 0 y t.

De los resultados obtenidos se deduce una relación lineal entre la función G y la concentración de tensioactivo empleado de la siguiente forma:

$$\log(C) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a) \quad [4.8]$$

Una reducción de luz del 50% corresponde a un valor de $G = 1$, ya que en este caso la intensidad de luz perdida será igual a la intensidad de luz remanente. En la Figura 4.8 se presenta, a título de ejemplo, la linealización para el tensioactivo APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar

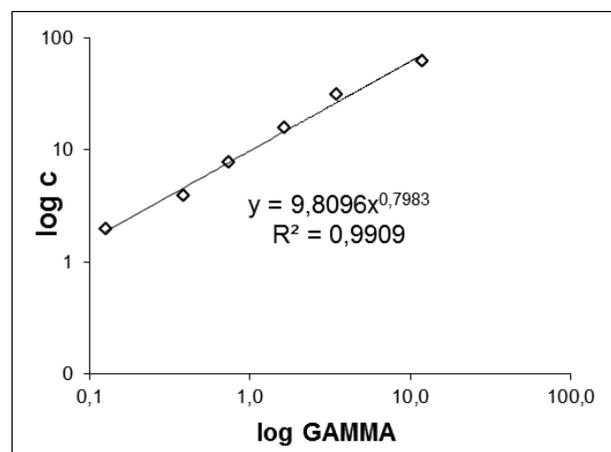


Figura 4.8. Relación lineal entre la función G y la concentración para el tensioactivo APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

4.4.1.6. *Determinación de los valores EC*

El valor de la toxicidad se mide como EC50 y EC20 que son, respectivamente, la concentración de tensioactivo en mg/L que produce una inhibición del 50% y del 20% después de 15 ó 30 minutos de exposición con el tóxico. Los valores de EC50 y EC20 se calculan dando a G los valores 1 y 0.25, respectivamente.

4.4.2. Ensayo de toxicidad con *Pseudomonas putida*

La medida de la toxicidad mediante el ensayo con *Pseudomonas putida*, se ha realizado conforme a la NORMA UNE-EN ISO 10712 (UNE-EN ISO 10712), utilizando bacterias *Pseudomonas putida* CECT 324 de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia) como microorganismos de prueba.

4.4.1.1. Fundamento

Las *Pseudomonas putida* son unas bacterias aerobias gram-negativas con flagelos móviles (de 0,7 μm a 1,1 μm de diámetro y de 2,0 μm a 4,0 μm de longitud), con flagelación polar. Es un microorganismo representativo de los microorganismos heterótrofos en agua dulce y es una de las cepas de mayor interés industrial entre las bacterias de género *Pseudomonas*, ya que unido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y de ser manejable desde el punto de vista genético.

En este ensayo se realiza la determinación del efecto inhibitorio del tensioactivo sobre la *Pseudomonas putida* mediante la medida del crecimiento celular bajo la influencia de varias disoluciones de la muestra a ensayar, comparándolo con el crecimiento celular de un cultivo obtenido bajo las mismas condiciones, pero sin el tensioactivo. Se determina la concentración celular por densidad óptica después de un periodo de 16 horas \pm 1h. Este procedimiento corresponde al establecido por la Norma UNE-EN ISO 10712:1996.

4.4.1.2. Reactivos y disoluciones

- **Bacterias *Pseudomonas putida* CECT 324**
- **Solución Nutriente:** Preparar las soluciones de reserva I-IV y después esterilizarlas a 121°C durante 10min.
 - Solución I: Disolver los siguientes compuestos en agua y diluir hasta 500 mL
 - 10,0 g de NaNO_3
 - 2,40 g de K_2HPO_4
 - 1,20 g de KH_2PO_4
 - 1,00 g de extracto de levadura

- Solución II: Disolver los siguientes compuestos en agua y diluir hasta 500 mL
 - 10,00 g de NaNO_3
 - 2,40 g de K_2HPO_4
 - 1,20 g de KH_2PO_4

- Solución III: Disolver los siguientes compuestos en agua y diluir hasta 500 mL
 - 40,0 g de D(+)-glucosa monohidratada ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) para uso microbiológico y bioquímico.

- Solución IV: Disolver los siguientes compuestos en agua y diluir hasta 1000 mL
 - 4,00 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 0,01 g de Citrato de Hierro (III) granulado

Medio de nutriente para el cultivo madre (agar inclinado)

1. Disolver 18g de agar en agua por calentamiento
2. Añadir 50 mL de solución I, 125 mL de Solución III, 100 mL de solución IV y diluir con agua hasta 1000 mL
3. Introducir cantidades de 6 a 10 mL del medio nutriente en tubos de cultivo mientras se mantiene líquido, cerrar los tubos y esterilizar durante 10min a 121°C .
4. Dejar solidificar el medio nutriente en posición inclinada y almacenar de 2 a 4°C

Manejo del cultivo madre

Inocular los tubos de agar inclinado con una colonia de *Pseudomonas putida* cada uno. Iniciar nuevos cultivos madre con intervalos de una semana para mantener la cepa de ensayo.

Incubar los cultivos madre inoculados durante 24h a $25 \pm 4^\circ\text{C}$ (y almacenar a $25 \pm 4^\circ\text{C}$). Después de la incubación durante 24 horas puede producirse un pigmento verdoso. Este hecho es normal y no indica contaminación.

4.4.1.3. Equipo

Todo material de vidrio y tapones que entren en contacto con los cultivos de ensayo deberán esterilizarse antes de usarlos, si no se han esterilizado junto con las soluciones nutrientes.

Los equipos necesarios para el ensayo de toxicidad serán:

- Espectrofotómetro VARIAN Cary 100 Bio UV-Visible
- Microscopio de aumento mínimo x100
- pH-metro
- Cabina de temperatura controlada
- Matraces de cultivo
- Autoclave
- Baño termostatzado con agitación

4.4.1.4. Procedimiento

Preparación del precultivo

- Preparación del medio de precultivo

Se esterilizan 900mL de agua destilada en un recipiente adecuado y se añaden 25 mL de cada una de las soluciones I y III, y 50 mL de la solución IV.

Se distribuye el medio de precultivo en matraces Erlenmeyer de 250 mL para el cultivo en condiciones estériles.

- Preparación del inóculo para el precultivo

Se aclaran las células a partir del cultivo madre de agar inclinado una vez tengan 7 días con medio de precultivo estéril. Se diluye esta suspensión celular con medio estéril de precultivo para obtener una turbidez de 10 FNU en el precultivo, correspondiente a una absorbancia de 0,02 medida a 610nm respecto a un blanco hecho con medio estéril de precultivo.

Incubar durante $5 \pm 0,5$ horas a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Cuando la incubación se haya completado, se diluye la suspensión bacteriológica con el medio de cultivo a ensayar para dar la turbidez específica de 50 FNU, correspondiente a una absorbancia de 0,10 medida a 610nm respecto a un blanco hecho con medio estéril de precultivo.

El inóculo debe tomarse del precultivo durante la fase de crecimiento exponencial.

Preparación de los cultivos a ensayar

Se utilizarán matraces de 250 mL en los que se colocará un volumen de 100 mL.

Se distribuye 2,5 mL de cada una de las soluciones I y III y 5 mL de la solución IV, el agua de dilución y el tensioactivo a ensayar en los matraces y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 10 min.

Posteriormente se añade el inóculo, una vez que están los matraces fríos, de modo que se tenga una concentración inicial calculada de 5 FNU correspondiente a 10mL del inóculo bacteriológico preparado anteriormente. La concentración de inóculo se comprueba con el espectrofotómetro sobre los blancos.

Se cierran los matraces con tapones estériles permeables al aire o tapas de aluminio.

Incubación

Los cultivos de ensayo y de control se incuban a temperatura constante de $23\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante 16 horas.

Se utiliza el baño termostático con agitación para mantener la temperatura constante y que el vaivén evite la formación de depósitos de bacterias en las paredes de los matraces.

4.4.1.5. Evaluación de la inhibición y determinación de los valores EC

Después del periodo de incubación de 16 ± 1 hora, se realiza la medida de la turbidez.

El porcentaje de inhibición de multiplicación celular para cada concentración se calcula como

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_0} \quad [4.9]$$

Donde:

- B_n es la turbidez de la biomasa al final del periodo de ensayo para la n -ésima concentración de la muestra de ensayo
- B_c es la turbidez de la biomasa al final del periodo de ensayo en el control
- B_0 es la turbidez de la biomasa a tiempo 0 en el control

Se representan los valores de inhibición calculados frente a la concentración. El valor de EC_{50} se obtiene para una inhibición del crecimiento del 50%, de la línea recta a la que se ajustan los datos entre el 20 y el 70% aproximadamente.

4.5. Métodos de ensayo de la biodegradabilidad

4.5.1. Ensayo estático

Se utiliza este ensayo para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos. Viene recogido en la NORMA UNE 55-844-91 (UNE 55-844-91); “Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes”.

El método especificado en esta norma y sus anexos es el aprobado por la OCDE (OECD, 1993b). El Reglamento (CE) nº 648/2004 de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes reconoce como válido el citado método de la OCDE para determinar el índice de biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos y no iónicos contenidos en los detergentes (Reglamento nº 648, 2004). También se corresponde con en el anexo I de la Orden del Ministerio de Industria y Energía del 5 de Septiembre de 1985 sobre “Actualización de la determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos utilizados en la preparación de los detergentes”, (BOE 1985).

4.5.1.1. Fundamento del método

Se trata de un ensayo tipo “matraz abierto” que permite determinar la biodegradabilidad de tensioactivos. Los tensioactivos que se ensayan deben superar un porcentaje mínimo requerido para concluir que son biodegradables y que pueden utilizarse en aplicaciones comerciales. Es un ensayo sencillo y relativamente rápido, puesto que dura 21 días como máximo y además puede efectuarse simultáneamente para diferentes tensioactivos o para diferentes concentraciones de un mismo tensioactivo.

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos aerobios, procedentes de una población mixta y aireada, en una mezcla formada por la disolución nutriente, que es un medio acuoso de composición química definida apto para el desarrollo microbiano, y la disolución de ensayo, que contiene los tensioactivos que se deseen ensayar.

La disolución de ensayo debe estar libre de productos que puedan interferir en la determinación. Ciertos productos químicos, presentes en los medios acuosos o en el aire ambiente, pueden reducir, o incluso inhibir, la actividad de los microorganismos causantes de la biodegradación de los tensioactivos, retrasando el proceso o influyendo en el resultado final.

Entre estos productos se encuentran álcalis fuertes, metales tóxicos, bactericidas y disolventes orgánicos. Incluso los propios tensioactivos pueden inhibir la actividad de los

microorganismos si se encuentran presentes en concentraciones suficientemente elevadas (Jurado, 2004).

La muestra debe contener inicialmente una concentración de tensioactivo igual o superior a 5 mg/L y se coloca en un matraz cónico de 2 L de capacidad. El control de los microorganismos responsables de la biodegradación se comprueba mediante ensayos paralelos al tensioactivo problema, efectuados con tensioactivos aniónicos que sirven como patrones de biodegradación. El patrón aniónico utilizado ha sido el alquilbenceno sulfonato lineal (LAS, C11-14). Se aplica a los matraces una agitación continua de tipo orbital a razón de 125 carreras/vaivén que facilite la aireación de su contenido. La temperatura se mantiene a 25 °C durante todo el ensayo.

4.5.1.2. Reactivos y disoluciones

Todos los productos químicos utilizados en el ensayo son de calidad P.A. “calidad para análisis” o P.R.S. “calidad del reactivo purísimo”, el agua es destilada o de pureza equivalente, en cualquier caso exenta de sustancias tóxicas, especialmente de productos que contengan cobre.

Disolución Nutriente

Esta disolución se prepara añadiendo a 1 L de agua destilada 1 ml de cada una de las cuatro disoluciones siguientes:

- A. Se disuelven en 1000 ml de agua las siguientes cantidades de productos:
 - 8.5 g de dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K_2HPO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
 - 1.7 g de cloruro amónico (NH_4Cl , P.R.S.) de Panreac.
- B. Se disuelven en 1000 ml de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
- C. Se disuelven en 1000 ml de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl_2 , P.A.) de Panreac.

- D. Se disuelven en 1000 ml de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.

La disolución nutriente se prepara inmediatamente antes de su uso en el ensayo de biodegradación.

Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada (calidad Milli-Q con resistividad de 18.2 M Ω ·cm equivalente a la del agua pura). Dependiendo del tensioactivo puede ser necesario someter la disolución a un ligero calentamiento. La disolución de concentración de tensioactivo requerida (entre 0-100 mg/L) se obtiene por dilución de la disolución madre en agua desionizada.

Para el caso de tensioactivos que lo necesiten, se ajusta el pH a 7, mediante NaOH 1M y/o HCl 1M.

Disolución de tensioactivo aniónico (patrón blando)

A partir de una disolución madre de 1g/L de LAS se obtiene por dilución en agua desionizada una disolución hija de 5 mg/L que se empleará en el ensayo de biodegradación.

Inóculo

Aunque puede considerarse como inóculo adecuado cualquier fuente que proporcione microorganismos aerobios de una población mixta, el inóculo debe proceder preferentemente de un efluente secundario de buena calidad, tomado de una planta de depuración de agua con tratamiento biológico (fangos activos), que opere con vertidos urbanos en forma predominante. El inóculo se tomó de la estación depuradora de aguas residuales urbanas "UTE EDAR GRANADA SUR".

Es esencial al emplear el método por primera vez comprobar experimentalmente la actividad del inóculo, para ello se realizaron ensayos (Lechuga, 2005) con el tensioactivo aniónico patrón (LAS) utilizando cantidades variables de inóculo. De esta serie de ensayos previos se dedujo la cantidad y el tipo de inóculo necesario para provocar una biodegradación del patrón empleado, que debe estar comprendida entre el 90% y 95% dentro de los primeros 14 días del ensayo, aunque normalmente solo se requieren de 7 a 10 días.

Lechuga, (2005) ensayó dos tipos de inóculo: uno proveniente de fangos activados y otro del efluente secundario de la EDAR. Las cantidades ensayadas de ambos inóculos fueron:

5, 15 y 20 ml en 1.2 L de disolución nutriente, con 5 mg/L de tensioactivo aniónico. Los ensayos mostraron que en los 7 primeros días se había degradado el 100% del tensioactivo utilizando como inóculo agua tratada. Se descartaron los fangos activados como inóculo y cantidades de agua tratada mayores de 5 ml.

A continuación ensayó diferentes cantidades de inóculo proveniente del efluente secundario (0.5, 1 y 2 ml) sobre LAS. Los resultados revelaron que con 0.5 ml de inóculo a los 5 días se alcanza un 94 % de biodegradación para el tensioactivo aniónico. Por tanto estableció, que en todos los ensayos estáticos de biodegradación la cantidad de inóculo a utilizar es de 0.5 ml por 1200 ml de disolución nutriente, cumpliendo así los requisitos de la norma.

4.5.1.3. Equipos

En los ensayos estáticos de biodegradación se utilizó el agitador orbital modelo Rotabit de SELECTA. Se trata de una máquina agitadora por vaivén con capacidad para seis matraces cónicos que permite efectuar hasta 220 carreras de vaivén por minuto, con un recorrido de 5 a 10 cm cada una.

4.5.1.4. Preparación de muestras

La muestra problema de tensioactivo aniónico o no iónico y la muestra control del tensioactivo aniónico patrón se preparan de la siguiente forma: en un recipiente de vidrio de volumen adecuado y perfectamente limpio (apartado 3.5.) se procede a la mezcla de la disolución nutriente y el volumen necesario de disolución de tensioactivo a ensayar para obtener la concentración final deseada. A continuación se añaden 0.5 ml de inóculo por cada 1.2 L de mezcla a ensayar.

Antes de iniciar el ensayo, todo el volumen de muestra se somete a agitación durante 1 hora y aireación durante 15 minutos para homogeneizar el tensioactivo y evitar su acumulación en la interfase aire-agua, lo que podría determinar errores iniciales en la toma de muestra. Además inicialmente la disolución de ensayo no debe presentar espuma.

En todos los ensayos se prepara un blanco formado por la disolución nutriente y el inóculo, en cualquier caso exento de tensioactivo. También se somete a agitación durante 1 hora y aireación durante 15 minutos.

4.5.1.5. Procedimiento y condiciones de operación

Para ensayar la muestra problema y patrón, se introducen respectivamente 1.2 L de la disolución en sendos matraces cónicos de 2 L de capacidad; cada matraz se tapa con algodón hidrófobo para no impedir la circulación de aire entre el interior del matraz y la atmósfera que lo rodea.

Los matraces se colocan en el agitador orbital (SELECTA Rotabit) a 125 carreras de vaivén por minuto. El continuo vaivén del agitador proporciona la agitación necesaria para mantener la disolución aireada. La capacidad del agitador es de 6 matraces, por lo que normalmente se coloca uno con la disolución patrón y 5 con la muestra problema para el estudio de la biodegradación. En caso de que se ensayen dos tensioactivos diferentes se coloca uno con la disolución patrón y dos para cada tensioactivo.

El sistema de agitación se dispone en una estancia oscura y termostatizada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ equipada con resistencias eléctricas y refrigeración además de control de temperatura, las paredes se encuentran aisladas con poliuretano. La atmósfera ambiente debe mantenerse libre de contaminantes y productos tóxicos, especialmente de disolventes clorados. La cámara dispone de una lámpara de radiación ultravioleta que se conecta 1 hora antes del inicio del ensayo para esterilizar la misma.

Los volúmenes de muestra deben ser lo suficientemente grandes como para permitir el análisis de la biodegradación por el método analítico que corresponda. En cualquier caso las muestras se depositan en material de vidrio perfectamente limpio o en frascos de plástico asépticos.

Durante los ensayos de biodegradación se toman diferentes muestras para la determinación del carbono total orgánico, la concentración residual de tensioactivo y la tensión superficial.

A los 28 días se da por finalizado el ensayo de biodegradación.

En la Figura 4.9 se esquematiza el protocolo realizado y los métodos de análisis empleados para la toma de muestras.

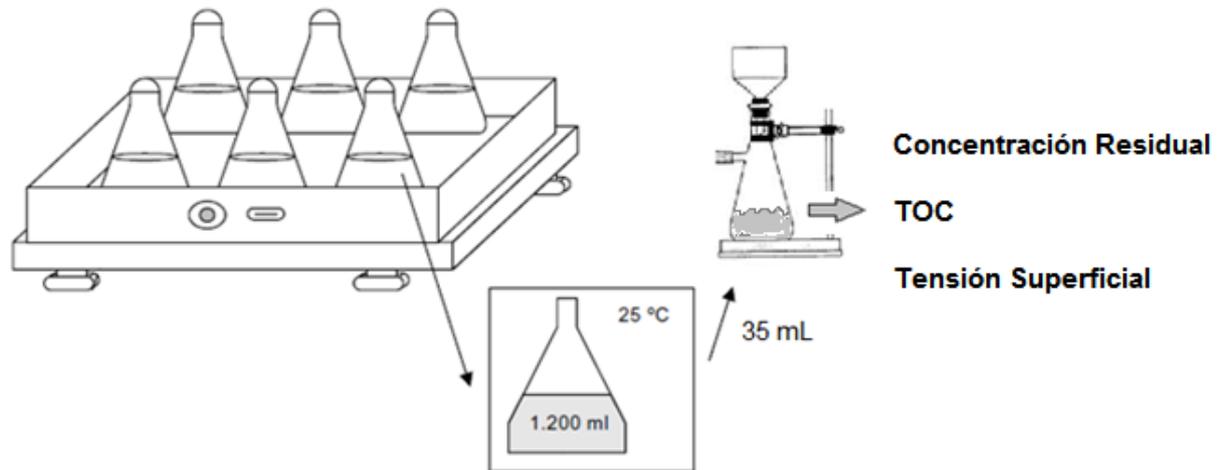


Figura 4.9. Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación

4.5.1.6. Seguimiento de la biodegradación

Para el tensioactivo problema se toman muestras durante los 28 días que como máximo dura el ensayo, siendo la primera de ellas la que sigue a la inoculación, a esta muestra se le denomina muestra a “tiempo cero”. La frecuencia de la toma de muestras depende del tensioactivo y de las medidas de carbono orgánico total.

Para el tensioactivo aniónico utilizado como patrón se analiza la biodegradación el primer y quinto día del ensayo tras la inoculación, aunque también es posible seguir la biodegradación durante los 28 días.

El seguimiento de la biodegradación se observa mediante la disminución del carbono orgánico total medido, o del tanto por ciento de tensioactivo residual, evaluado por técnicas espectrofotométricas.

Las determinaciones en el quinto día sirven para dar una indicación sobre si el inóculo empleado es efectivo. Para que los resultados del ensayo sean válidos, el patrón blando de tensioactivo aniónico debe biodegradarse hasta un valor comprendido entre 90 y 95% al cabo de 14 días de ensayo, si esto no sucede debe repetirse todo el ensayo (El experimento es rechazado y se propone otro en las mismas condiciones).

En cualquier caso se aceptan como válidos todos los ensayos en los que el % de biodegradación del patrón blando al cabo de 5 días es mayor del 90%.

4.6 Determinación de la tensión superficial

4.6.1. Fundamento del método

Existen distintos métodos para medir la tensión superficial, entre ellos están los métodos basados en la medición de una fuerza y dentro de estos el utilizado en concreto sería el método del plato (Wilhelmy) (Figura 4.10).

En este método se mide la fuerza hacia abajo que sobre una placa lisa ejerce la superficie o interfase a la cual se desea determinar la tensión cuando esta placa toca exactamente esa superficie o interfase.

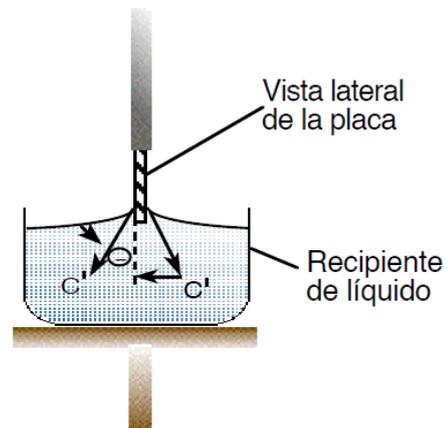


Figura 4.10. Esquema del método del plato para la medida de la tensión superficial (Jean L. Salager, 2005)

4.6.2. Equipo

El equipo utilizado es un tensiómetro KRÜSS TENSIO METER K11 como puede verse en la figura 4.11 acoplado a un baño termostatzado (a la izquierda en la foto).



Figura 4.11. Fotografía del tensiómetro KRÜSS TENSIO METER K11.

4.6.3. Procedimiento

1. Antes de medir, lavamos muy bien los vasos que se vayan a utilizar tal y como se describe en el apartado “4.8 Protocolo de limpieza” y quemamos la placa hasta ponerla al rojo vivo para eliminar cualquier impureza orgánica.
2. Encendemos el equipo auxiliar de termostatzado y seleccionamos la temperatura de consigna deseada.
3. Se vierte la muestra a la cual queremos determinar su tensión superficial en el vaso y se coloca en tensiómetro.
4. Se selecciona en la interfaz grafica del equipo lo siguiente:
 - a. Metodo de medida: “Plate”
 - b. Numero de medidas: 30
 - c. Intervalo entre medidas: 0,5 segundos

Nos aseguramos de que la temperatura medida por el tensiómetro es la temperatura de consigna deseada, en caso contrario se debe esperar hasta que esta se alcance.

5. Se ajusta la placa, con ayuda de la ruleta de posición, en torno a 1mm por encima de la interfase y se ejecuta la orden de medida en el tensiómetro.
6. Trascurridos unos 20 segundos, se muestra en la interfaz grafica el valor de la tensión superficial con su desviación estándar y la temperatura a la que se ha medido.
7. La CMC (Concentracion micelar crítica) puede obtenerse de la intersección de las rectas de las pendientes de la parte inicial y final de la curva obtenida al representar los datos.

4.7. Determinación de la CMC por conductimetría

4.7.1. Fundamento del método

El método conductimétrico consiste en medir la conductividad (k) de disoluciones que contienen distinta concentración de un tensioactivo iónico. La representación de los datos de conductividad frente a concentración de tensioactivo es una curva cuyas pendientes, antes y después de la CMC, son diferentes. A título de ejemplo se muestra en la figura 4.12 la representación de los datos de conductividad frente a concentración para el LAS-R₁₁₋₁₄.

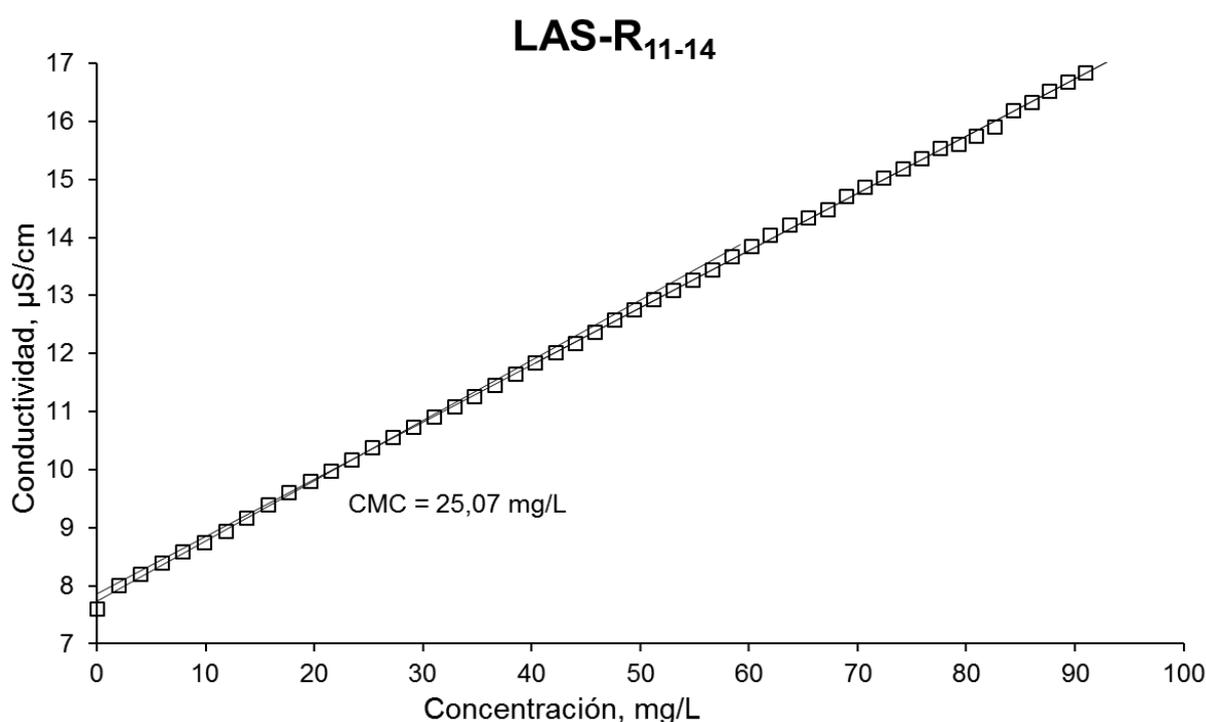


Figura 4.12. Representación de la conductividad frente a la concentración para el LAS-R₁₁₋₁₄

4.7.2. Equipo

El equipo utilizado para la medida de la conductividad ha sido un conductímetro de la marca METERLAB modelo CDM210

4.7.3. Procedimiento

Se añaden volúmenes conocidos de una disolución del tensioactivo, de concentración conocida de forma sucesiva; agitando hasta que se establezca la disolución haciendo una lectura de la conductividad después de cada una de las adiciones.

Una vez terminada la adición de disolución de tensioactivo, se obtiene una tabla de volumen añadido y conductividad. A partir de los datos experimentales se calcula la concentración de tensioactivo después de cada una de las adiciones y se representa frente a la medida de conductividad experimental correspondiente.

La CMC se estima según el punto de corte de las rectas que se obtienen antes y después de la CMC.

4.8. Protocolo de limpieza

4.8.1. Limpieza del material corriente de laboratorio

Todo el material corriente de laboratorio, utilizado en ensayos o en análisis, se somete a un protocolo de limpieza para eliminar cualquier resto de agentes de superficie que pueda interferir en los resultados de los análisis. El protocolo seguido es el siguiente:

- Limpieza del material de vidrio con NOCHROMIX® (Persulfato de amonio y metales traza) en H_2SO_4
- Enjuague con agua corriente.
- Enjuague final con agua desionizada.

Finalmente antes de usar el material, éste se seca en una estufa hasta que quede perfectamente seco.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

5.1. Métodos de análisis

5.1.1. Recta de calibración para la determinación del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.1 Valores de absorbancia a distintas concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizando el método de la antrona

EXPERIMENTO C-2		Recta de calibrado para el APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	Temperatura, °C:	Ambiente	
Medida de la Concentración:	Antrona	Blanco hecho con:	Agua destilada	
Absorbancia a distintas concentraciones de APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}				
[T], mg/L	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
0	0,0479	0,1103	0,0916	0,1053
5	0,0952			
10	0,1214			
20	0,1458	0,1553		
30	0,1826			
40	0,2166	0,2374	0,2452	
50	0,2764	0,2806	0,2776	0,292
60	0,3193	0,3147		
70	0,3578			
80	0,4027	0,3821	0,4176	
90	0,4468			
100	0,4499	0,4591	0,461	0,4612

5.1.2. Recta de calibración para la determinación del LAS-R₁₁₋₁₄**Tabla 5.2** Valores de absorbancia a distintas concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ utilizando el método del Azul de Metileno

EXPERIMENTO C-2		Recta de calibrado para el LAS-R₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄	Temperatura, °C:	Ambiente	
Medida de la Concentración:	MBAS	Blanco hecho con:	Cloroformo	
Absorbancia a distintas concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄				
[T], mg/L	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
0	0,1679	0,179	0,1843	0,1221
0,5	0,2091	0,2059		
1	0,3158	0,296	0,2938	0,2874
1,5	0,3969	0,425		
2	0,4696	0,478	0,4281	0,4503
2,5	0,542	0,5506		
3	0,6268	0,6622	0,6716	0,6029
3,5	0,7169	0,7774		
4	0,8371	0,8763	0,7753	0,7987
4,5	0,9199	0,9362	0,9536	
5	0,9824	0,9717	0,9856	

5.1.3. Recta de calibración para la determinación del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁**Tabla 5.3** Valores de absorbancia a distintas concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizando el método del Yodo/Yoduro

EXPERIMENTO C-3		Recta de calibrado para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁			
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	Temperatura, °C:	Ambiente		
Medida de la Concentración:	Yodo/Yoduro	Blanco hecho con:	Aire		
Absorbancia a distintas concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁					
[T], mg/L	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5
0	0,3378	0,3433	0,3592	0,3701	0,3573
2	0,4254	0,4381			
5	0,5933	0,6004	0,5835	0,5816	
10	0,862	0,8672	0,8925	0,8573	0,8674
15	1,1317	1,1779	1,1956	1,2065	1,186
20	1,4602	1,5072	1,5096	1,4582	1,4871

5.1.4. Recta de calibración para la determinación del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀**Tabla 5.4.** Valores de absorbancia a distintas concentraciones de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizando el método del Azul de Metileno

EXPERIMENTO C-2		Recta de calibrado para el LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo: EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		Temperatura, °C: Ambiente		
Medida de la Concentración: MBAS		Blanco hecho con: Aire		
Absorbancia a distintas concentraciones de LAS-R ₁₁₋₁₄				
[T], mg/L	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
0	0,1626	0,1506	0,1745	
2	0,2515	--	0,2914	
4	0,3677	0,3692	0,4017	
6	0,4971	0,5091	0,4756	
8	0,6440	0,6144	0,6081	

5.2. Tensión superficial

5.2.1. APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.5. Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-1			Tensión superficial del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:		APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	Temperatura, °C:		25
Calidad del agua:		Destilada			
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est
0,000	69,940	0,365	41,284	31,767	0,351
0,998	66,225	0,427	45,455	31,850	0,071
2,982	58,400	0,000	49,550	30,900	0,265
4,950	53,250	0,443	53,571	30,600	0,436
6,903	49,167	0,058	57,522	30,400	0,173
8,841	46,120	0,396	61,404	29,750	0,495
10,763	43,800	0,700	68,966	29,700	0,000
12,671	41,800	0,346	76,271	29,550	0,354
14,563	40,100	0,906	83,333	29,300	0,000
16,441	39,125	0,634	90,164	28,867	0,208
18,304	37,733	0,208	96,774	28,550	0,212
20,154	36,725	0,386	115,385	28,250	0,212
21,989	36,550	0,208			
23,810	35,660	0,792			
28,302	34,400	0,794			
32,710	32,633	0,321			
37,037	32,325	0,310			

5.2.2. LAS-R₁₁₋₁₄**Tabla 5.6.** Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-2			Tensión superficial del LAS-R₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:		LAS-R ₁₁₋₁₄	Temperatura, °C:		25
Calidad del agua:		Destilada			
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est
0,000	70,500	0,704	34,749	47,960	0,207
0,000	70,467	0,252	36,609	47,740	0,230
0,999	69,850	0,071	40,307	47,180	0,319
1,996	69,400	0,300	43,977	46,280	0,192
4,975	64,600	0,265	47,619	45,050	0,300
7,937	60,933	0,569	51,233	44,800	0,255
11,858	58,700	0,265	54,820	44,325	0,206
15,748	56,667	0,503	58,380	43,620	0,249
19,608	54,900	0,058	61,914	43,250	0,129
19,608	54,900	0,707	65,421	43,150	0,265
21,526	53,867	0,058	68,901	43,000	0,000
23,438	53,180	0,319	74,074	42,700	0,100
25,341	52,060	0,462	79,190	42,000	0,141
27,237	51,400	0,346	84,249	41,667	0,351
29,126	50,760	0,581	89,253	41,075	0,403
31,008	49,920	0,295	94,203	40,925	0,350
32,882	48,360	0,365	102,334	40,225	0,340

Tabla 5.6.(continuación) Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-2			Tensión superficial del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:		LAS-R ₁₁₋₁₄	Temperatura, °C:		25
Calidad del agua:		Destilada			
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est
110,320	39,400	0,834	221,184	36,140	0,114
118,166	39,500	0,115	230,769	37,200	0,361
125,874	39,260	0,207	253,731	36,700	0,346
133,449	38,400	0,141	275,362	36,200	0,600
140,893	38,525	0,236	295,775	35,500	0,100
148,211	38,250	0,058	324,324	35,600	0,000
155,405	37,950	0,100	350,649	34,600	0,361
162,479	37,700	0,183	375,000	34,150	0,071
169,435	37,200	0,212	411,765	34,867	0,306
176,277	37,200	0,200	444,444	34,933	0,208
180,328	38,000	0,200	473,684	35,000	0,424
186,330	37,000	0,183	500,000	33,933	0,208
193,548	38,067	0,153	523,810	33,267	0,451
196,141	36,575	0,222			
206,349	37,800	0,100			
208,861	36,475	0,222			
218,750	37,633	0,306			

5.2.3. FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁**Tabla 5.7.** Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-3		Tensión superficial del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁			
Tensioactivo: FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		Temperatura, °C: 25			
Calidad del agua: Destilada					
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est
0,000	69,367	0,252	10,490	35,900	0,000
0,998	48,950	0,212	10,978	36,000	0,283
1,992	48,833	0,351	11,466	35,200	0,141
2,982	45,150	0,212	11,952	34,767	0,451
3,968	43,450	0,071	12,438	34,267	0,208
4,950	42,133	0,231	12,922	33,450	0,071
5,000	44,950	0,212	13,406	33,550	0,212
5,495	41,450	0,212	13,889	33,300	0,000
5,988	39,850	0,354	14,371	33,350	0,071
6,481	39,850	0,071	15,000	32,700	0,141
6,972	39,300	0,141	15,968	32,300	0,283
7,463	38,850	0,071	16,932	32,500	0,141
7,952	37,350	0,071	17,893	31,650	0,071
8,441	37,200	0,141	18,849	32,100	0,000
8,929	36,350	0,071	20,000	34,600	0,141
9,415	35,950	0,071	20,958	34,100	0,000
10,000	37,250	0,071	21,912	33,733	0,321

Tabla 5.7. (Continuación) Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-3			Tensión superficial del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:		FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	Temperatura, °C:		25
Calidad del agua:		Destilada			
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y _{media} , mN/m	Desv.Est
22,863	32,550	0,071			
23,810	32,700	0,283			
100,000	32,73	0,145			
500,000	32,750	0,212			

5.2.4. EC-R₁₂₋₁₄E₁₀**Tabla 5.8.** Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-3			Tensión superficial del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		Temperatura, °C:	25	
Calidad del agua:	Destilada				
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est	[T], mg/L	Y_{media}, mN/m	Desv.Est
5	52,18	0,536	75	31,54	0,462
10	47,12	0,342	100	30,7	0,235
25	38,66	0,279	200	31,18	0,110
30	36,72	1,064	250	31,34	0,055
40	35,04	0,777	300	31,2	0,071
50	33,4	0,430	400	31,04	0,167

5.3. Conductividad**Tabla 5.9.** Datos de Conductividad a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-5		Tensión superficial del LAS-R₁₁₋₁₄			
Tensioactivo: LAS-R ₁₁₋₁₄		Temperatura, °C: 25			
Calidad del agua: Destilada					
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	K, μS/cm	[T], mg/L	K, μS/cm	[T], mg/L	K, μS/cm
0,00	7,59	32,88	11,08	63,67	14,20
2,00	8,00	34,75	11,25	65,42	14,33
3,98	8,19	36,61	11,44	67,16	14,47
5,96	8,38	38,46	11,63	68,90	14,69
7,94	8,57	40,31	11,82	70,63	14,85
9,90	8,74	42,15	12,00	72,36	15,01
11,86	8,93	43,98	12,17	74,07	15,18
13,81	9,15	45,80	12,35	75,79	15,35
15,75	9,38	47,62	12,56	77,49	15,52
17,68	9,59	49,43	12,74	79,19	15,60
19,61	9,79	51,23	12,92	80,88	15,74
21,53	9,97	53,03	13,08	82,57	15,90
23,44	10,16	54,82	13,25	84,25	16,17
25,34	10,36	56,60	13,43	85,92	16,32
27,24	10,54	58,38	13,65	87,59	16,50
29,13	10,72	60,15	13,83	89,25	16,66
31,01	10,89	61,91	14,02	90,91	16,83

Tabla 5.9.(Continuación) Datos de Conductividad a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

EXPERIMENTO T-5		Tensión superficial del LAS-R ₁₁₋₁₄			
Tensioactivo: LAS-R ₁₁₋₁₄		Temperatura, °C: 25			
Calidad del agua: Destilada					
Datos de Concentración – Tensión superficial					
[T], mg/L	K, µS/cm	[T], mg/L	K, µS/cm	[T], mg/L	K, µS/cm
92,56	17,01	119,72	19,62	145,30	22,14
94,20	17,19	121,27	19,77	146,76	22,29
95,84	17,34	122,81	19,92	148,21	22,41
97,47	17,50	124,34	20,06	149,66	22,54
99,10	17,63	125,87	20,21	151,10	22,67
100,72	17,78	127,40	20,35	152,54	22,82
102,33	17,95	128,92	20,50	153,98	22,95
103,94	18,10	130,43	20,62	155,41	23,08
105,55	18,25	131,94	20,78	156,83	23,21
107,14	18,41	133,45	20,97	158,25	23,34
108,73	18,55	134,95	21,11	159,66	23,50
110,32	18,70	136,44	21,28	161,07	23,62
111,90	18,85	137,93	21,44	162,48	23,77
113,48	19,00	139,41	21,59	163,88	23,89
115,04	19,18	140,89	21,73	165,28	24,01
116,61	19,33	142,37	21,86	166,67	24,14
118,17	19,48	143,84	21,99	168,05	24,27

5.4. Ozonización de tensioactivos

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de ozonización realizados según el procedimiento descrito en el apartado 4.2, quedando recogidos en las tablas los datos de las condiciones experimentales bajo las que se llevaron a cabo los ensayos.

5.4.1. APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.10. Concentraciones residuales de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} para el ensayo de ozonización

EXPERIMENTO E-1.1		Concentraciones Residuales de Tensioactivo			
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	Temperatura, °C:	25		
Concentración O₃, g/Nm³	113	pH inicial:	8		
Caudal de O₃, Ln/h :	5	Concentración			
Medida de la Concentración:	Antrona	inicial, mg/L:	80 (+2%Sal)		
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	80,00	81,57	80,00	80,52	0,91
2,5	74,98	72,35	71,22	72,85	1,93
5	68,10	70,37	66,28	68,25	2,05
7,5	63,61	65,00	64,45	64,35	0,70
10	58,95	63,44	57,85	60,08	2,96
15	52,30	50,70	50,11	51,04	1,13
20	41,61	46,53	44,27	44,14	2,46
25	41,51	38,12		39,82	2,39
30	33,98	31,80	30,50	32,09	1,76

Tabla 5.11. TOC residual para el ensayo de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

EXPERIMENTO E-1.2		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	Temperatura, °C:	25			
Concentración O₃, g/Nm³	113	pH inicial:	8			
Caudal de O₃, Ln/h :	5					
Medida de la Concentración:	TOC-V CSH					
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L						
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.	Mineralización, %
0	23,04	23,99	25,36	24,13	1,17	0,00
2,5	22,10	23,12	23,14	22,79	0,59	8,75
5	21,85	23,54	23,45	22,95	0,95	7,53
10	22,87	22,84	23,85	23,19	0,57	5,95
20	21,45	22,38	23,13	22,32	0,84	8,79
30	20,04	20,52	21,02	20,53	0,49	17,11

Tabla 5.12. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

EXPERIMENTO E-1.3		Tensión superficial			
Tensioactivo:		APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		Temperatura, °C: 25	
Concentración O ₃ , g/Nm ³		113		pH inicial: 8	
Caudal de O ₃ , Ln/h :		5			
Medida de la Tensión Superficial:		Krüss K11 Mk1			
Tensión superficial, mN/m					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	29,50	30,50	30,10	30,03	0,503
2,5	32,78	31,40	--	32,09	0,976
5	35,10	32,70	35,50	34,43	1,514
10	38,60	36,30	40,90	38,60	2,300
20	45,30	44,90	55,30	48,50	5,892
30	47,60	54,10	57,60	53,10	5,074

5.2.2. LAS-R₁₁₋₁₄**Tabla 5.13.** Concentraciones residuales de LAS-R₁₁₋₁₄ para el ensayo de ozonización

EXPERIMENTO E-2.1		Concentraciones Residuales de Tensioactivo			
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄	Temperatura, °C:	25		
Concentración O₃, g/Nm³	113	pH inicial:	8		
Caudal de O₃, Ln/h :	5	Concentración			
Medida de la Concentración:	MBAS	inicial, mg/L:	80		
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	80,00	80,00	80,00	80,00	0,000
2,5	--	59,90	--	59,90	--
5	37,70	--	37,00	48,60	16,400
7,5	--	38,83	--	43,99	7,299
10	26,98	31,59	31,22	32,68	2,221
15	23,93	25,17	24,31	24,74	0,614
20	21,06	22,66	20,66	23,62	3,543
25	20,94	20,83	18,34	19,58	1,757
30	17,00	--	--	17,00	--

Tabla 5.14. TOC residual para el ensayo de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

EXPERIMENTO E-2.2		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄	Temperatura, °C:	25			
Concentración O ₃ , g/Nm ³	113	pH inicial:	8			
Caudal de O ₃ , Ln/h :	5					
Medida de la Concentración:	TOC-V CSH					
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L						
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.	Mineralización, %
0	25,75	25,35	27,12	0,00	0,928	0,00
5	24,35	22,73	23,96	9,14	0,846	9,14
10	24,53	23,03	24,24	8,17	0,796	8,17
15	23,73	23,29	24,5	8,54	0,612	8,54
20	23,24	22,93	24,42	9,75	0,786	9,75
25	23,15	22,65	24,12	10,60	0,747	10,60
30	22,97	22,46	23,61	11,71	0,576	11,71

Tabla 5.15. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

EXPERIMENTO E-2.3		Tensión superficial			
Tensioactivo:		LAS-R ₁₁₋₁₄		Temperatura, °C: 25	
Concentración O ₃ , g/Nm ³		113		pH inicial: 8	
Caudal de O ₃ , Ln/h :		5			
Medida de la Tensión Superficial:		Krüss K11 Mk1			
Tensión superficial, mN/m					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	41,70	41,8	41,8	41,77	0,058
5	45,20	45,30	45,50	45,40	0,141
10	42,30	43,50	44,40	43,40	1,054
15	41,30	42,70	43,30	42,43	1,026
20	43,70	43,60	43,40	43,57	0,153
25	45,30	45,90	46,20	45,80	0,458
30	46,20	47,10	47,50	46,93	0,666

5.2.3. FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁**Tabla 5.16.** Concentraciones residuales de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ para el ensayo de ozonización

EXPERIMENTO E-3.1		Concentraciones Residuales de Tensioactivo			
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	Temperatura, °C:	25		
Concentración O₃, g/Nm³	113	pH inicial:	8		
Caudal de O₃, Ln/h :	5	Concentración			
Medida de la Concentración:	Yodo/Yoduro	inicial, mg/L:	80		
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	80,00	80,00	80,00	80,00	0,000
2,5	34,72	31,72	28,17	31,54	3,279
5	19,46	20,75	18,35	19,52	1,202
7,5	12,65	14,67	13,46	13,59	1,021
10	10,62	11,99	11,80	11,47	0,746
20	8,35	8,46	8,23	8,35	0,115
30	7,70	7,09	7,57	7,45	0,321

Tabla 5.17. TOC residual para el ensayo de ozonización del FAE-R_{12-14E11}

EXPERIMENTO E-3.2		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:	FAE-R _{12-14E11}	Temperatura, °C:	25			
Concentración O ₃ , g/Nm ³	113	pH inicial:	8			
Caudal de O ₃ , Ln/h :	5					
Medida de la Concentración:	TOC-V CSH					
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L						
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.	Mineralización, %
0	46,93	49,17	49,56	48,55	1,42	0
2,5	44,5	46,77	48,07	46,45	1,81	4,33887134
5	45,21	47,68	47,85	46,91	1,48	3,37772896
10	45,63	48,39	47,95	47,32	1,48	2,53329672
20	44,57	46,98	46,64	46,06	1,30	5,12838116
30	42,63	44,45	44,15	43,74	0,98	9,90663188

Tabla 5.18. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

EXPERIMENTO E-3.3		Tensión superficial			
Tensioactivo: FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		Temperatura, °C: 25			
Concentración O₃, g/Nm³ 113		pH inicial: 8			
Caudal de O₃, Ln/h : 5					
Medida de la Tensión Superficial: Krüss K11 Mk1					
Tensión superficial, mN/m					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	32,40	32,50	32,40	32,43	0,06
2,5	29,20	30,40	29,70	29,77	0,60
5	28,60	29,00	29,10	28,90	0,26
10	30,00	30,50	30,90	30,47	0,45
20	30,90	31,50	33,20	31,87	1,19
30	32,77	33,40	35,70	33,96	1,54

5.2.4. EC-R₁₂₋₁₄E₁₀**Tabla 5.19.** Concentraciones residuales de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ para el ensayo de ozonización

EXPERIMENTO E-4.1		Concentraciones Residuales de Tensioactivo			
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	Temperatura, °C:	25		
Concentración O₃, g/Nm³	113	pH inicial:	8		
Caudal de O₃, Ln/h :	5	Concentración			
Medida de la Concentración:	MBAS	inicial, mg/L:	80		
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	78,18	83,93	81,12	79,08	6,136
2,5	46,57	47,79	45,67	46,68	1,064
5	33,32	29,74	30,15	31,07	1,957
7,5	29,19	25,00	27,34	27,18	2,102
10	--	--	24,50	24,50	--
15	20,26	17,29	19,45	19,00	1,537
20	72,18	12,38	13,23	12,81	0,599
25	46,57	83,93	81,00	79,08	6,136
30	33,32	47,79	45,67	46,68	1,064

Tabla 5.20. TOC residual para el ensayo de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

EXPERIMENTO E-4.2		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	Temperatura, °C:	25			
Concentración O ₃ , g/Nm ³	113	pH inicial:	8			
Caudal de O ₃ , Ln/h :	5					
Medida de la Concentración:	TOC-V CSH					
Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L						
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.	Mineralización, %
0	43,44	41,38	42,99	42,60	0,002	0,000
2,5	42,04	42,72	41,98	42,25	0,411	0,833
5	41,21	41,22	41,12	41,18	0,055	3,329
7,5	--	--	40,34	40,34	--	5,309
10	39,911	39,576	39,76	39,75	0,168	6,696
20	40,14	--	--	40,72	0,824	4,411
30	--	39,33	38,94	39,14	0,276	8,137

Tabla 5.21. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

EXPERIMENTO E-4.3		Tensión superficial			
Tensioactivo:		EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	Temperatura, °C:		25
Concentración O ₃ , g/Nm ³		113	pH inicial:		8
Caudal de O ₃ , Ln/h :		5			
Medida de la Tensión Superficial:		Krüss K11 Mk1			
Tensión superficial, mN/m					
Tiempo, min	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Media	Desv.Est.
0	34,8	34,1	34,3	34,40	0,36
2,5	40,5	39,5	40,7	40,23	0,64
5	37,3	36,7	36,5	36,83	0,42
10	34,7	35,1	34,9	34,90	0,20
20	32,0	32,3	32,1	32,13	0,15
30	38,8	38,3	38,4	38,50	0,26

5.5. Biodegradabilidad de tensioactivos

En las Tabla 5.22 y 5.23 se muestran los resultados experimentales que se han obtenido en los ensayos de biodegradación. En estas tablas se muestra el tensioactivo ensayado, el tipo de ensayo y el método de análisis utilizado.

5.5.1. Biodegradabilidad del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}**Tabla 5.22.** Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

EXPERIMENTO B-1		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:		APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}				
Ensayo de Biodegradación:		Estático				
Medida de la Concentración:		Antrona				
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O₃, min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O₃:	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O₃, Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
0	15,00	9,38	8,42	35,70	20,30	
16	15,37	8,26	4,26	33,85	15,31	
24,5	14,66	7,94	--	31,55	--	
40,25	13,17	--	1,15	27,49	--	
44,75	12,71	--	0,10	22,30	10,68	
112	11,25	2,04	0,00	21,15	--	
122	9,50	1,16		16,71	1,08	
136	8,14	0,00		14,98	--	
163,5	6,94			13,82	--	
192,5	--			--	0,60	
212	--			14,64	0,00	
281	--			--		
306	--			--		
338,5	--			--		
380,5	1,08			5,37		
456	0,00			--		
505				--		
623,25				0,00		

Tabla 5.22. (Continuación) Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

EXPERIMENTO B-1		TOC				
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}					
Ensayo de Biodegradación:	Estático					
Medida de la Concentración:	TOC					
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O ₃ , min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O ₃ :	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O ₃ , Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	TOC, mg/L					
0	4,669	6,784	6,317	7,783	11,7	
16	4,629	6,82	6,975	9,978	12,54	
24,5	5,034	5,615	4,972	10,46	11,45	
40,25	4	3,583	3,351	7,445	8,464	
44,75	3,661	3,165	3,606	7,063	6,762	
112	2,375	3,027	2,248	5,953	6,654	
122	2,409	3,181	2,02	7,286	6,12	
136	3,247	2,222	3,715	5,957	4,378	
163,5	1,958	2,484	2,303	5,449	2,994	
192,5	1,532	1,733	1,783	5,006	2,205	
212	0,927	1,267	1,2	4,553	2,063	
281	1,365	1,172	0,907	4,064	2,574	
306	0,996	1,236	1,242	3,869	2,231	
338,5	0,767	1,682	1,159	3,526	1,534	
380,5	0,712	1,287	1,349	3,603	1,76	
456	0,601	1,058	0,924	2,933	1,418	
505	0,761	1,412	1,23	3,246	1,76	
623,25	0,653	1,204	1,034	3,002	1,521	
648	0,604	1,135	0,968	2,954	1,256	

Tabla 5.22. (Continuación) Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

EXPERIMENTO B-1		Tensión Superficial				
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}					
Ensayo de Biodegradación:	Estático					
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O ₃ , min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O ₃ :	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O ₃ , Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	Tensión Superficial, mN/m					
0	56,20	46,20	41,35	55,30	58,05	
16	46,20	49,90	48,37	55,90	56,65	
24,5	54,15	42,85	41,70	55,95	58,65	
40,25	62,65	42,40	42,10	63,50	51,25	
44,75	51,75	48,20	41,30	55,95	55,90	
112	65,85	62,10	42,50	58,60	57,75	
122	69,37	50,80	49,40	55,35	63,20	
136	64,80	59,50	49,20	62,90	59,70	
163,5	65,80	64,30	52,00	65,60	66,50	
192,5	68,20	67,00	55,00	65,80	69,10	
212	67,90	--	57,40	68,30	69,90	
281	69,00	65,90	56,60	69,60	67,10	
306	69,40	67,60	59,80	69,50	68,00	
338,5	67,20	63,90	60,70	65,00	64,70	
380,5	67,10	67,50	60,20	68,50	65,00	
456	68,20	65,60	65,10	68,50	66,30	
505	67,90	66,00	64,00	69,20	68,50	
623,25	68,20	67,50	65,30	68,50	67,90	
648	69,40	68,20	66,10	69,30	68,90	

5.5.2. Biodegradabilidad del LAS-R₁₁₋₁₄Tabla 5.23. Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el LAS-R₁₁₋₁₄

EXPERIMENTO B-2		Concentraciones Residuales de Tensioactivo				
Tensioactivo:		LAS-R ₁₁₋₁₄				
Ensayo de Biodegradación:		Estático				
Medida de la Concentración:		Antrona				
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O ₃ , min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O ₃ :	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O ₃ , Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	Concentraciones Residuales de Tensioactivo, mg/L					
0,00	15,34	0,60	0,00	35,00	6,74	
15,83	--	--	--	32,41	6,30	
25,83	12,47	--	--	32,13	5,09	
39,83	10,23	0,13	--	28,42	5,21	
63,83	11,65	0,00	--	32,70	--	
87,83	11,05	--	--	33,64	4,72	
92,83	11,65	--	--	26,16	3,49	
159,83	2,09	--	--	6,23	--	
183,83	0,71	--	--	0,47	0,17	
208,33	0,49	--	--	0,08	0,27	
259,33	0,08	--	--	0,30	0,00	
332,83	0,00	--	--	0,00	--	
382,33	--	--	--	--	--	
495,83	--	--	--	--	--	
551,83	--	--	--	--	--	
663,83	--	--	--	--	--	

Tabla 5.23. (Continuación) Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el LAS-R₁₁₋₁₄

EXPERIMENTO B-2		TOC				
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄					
Ensayo de Biodegradación:	Estático					
Medida de la Concentración:	TOC					
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O ₃ , min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O ₃ :	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O ₃ , Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	TOC, mg/L					
0,00	4,204	3,501	2,987	10,03	10,29	
15,83	4,058	2,693	3,083	9,432	7,744	
25,83	4,35	2,946	4,324	11,1	8,532	
39,83	4,663	3,553	3,061	11,59	8,22	
63,83	4,202	3,006	2,214	10,72	7,461	
87,83	4,047	2,222	1,831	10,49	7,541	
92,83	3,971	1,385	1,562	10,21	7,487	
159,83	3,113	1,071	0,828	6,867	8,275	
183,83	3,272	1,261	0,7	6,349	7,114	
208,33	2,521	0,92	0,856	6,079	7,871	
259,33	2,541	1,596	0,455	6,867	6,05	
332,83	2,664	0,785	1,132	5,723	5,995	
382,33	2,351	1,167	0,675	5,442	5,518	
495,83	3,795	0,889	0,566	5,655	5,774	
551,83	2,753	--	0,9	5,7	1,048	
663,83	2,041	0,696	0,702	6,003	--	

Tabla 5.23. (Continuación) Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el LAS-R₁₁₋₁₄

EXPERIMENTO B-2		Tensión Superficial				
Tensioactivo:		LAS-R ₁₁₋₁₄				
Ensayo de Biodegradación:		Estático				
Condiciones Iniciales del Ensayo						
Nº Matraz - Curva	1	2	3	4	5	
Concentración:	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	35 mg/L	35 mg/L	
	No Ozonizado	Ozonizado	Ozonizado	No Ozonizado	Ozonizado	
Tiempo de O ₃ , min:	--	15min	30min	--	15min	
% de O ₃ :	--	75%	75%	--	75%	
Caudal de O ₃ , Ln/h :	--	5	5	--	5	
Tiempo, h	Tensión Superficial, mN/m					
0,00	47,25	59,85	62,20	39,20	62,30	
15,83	--	62,90	59,50	40,20	53,20	
25,83	45,15	55,65	57,80	39,30	50,00	
39,83	43,65	57,60	55,50	39,00	48,20	
63,83	43,30	59,45	56,70	38,20	54,30	
87,83	46,35	56,15	56,60	39,90	52,20	
92,83	46,95	60,45	61,00	40,10	51,10	
159,83	56,95	60,50	64,30	49,70	53,30	
183,83	61,00	63,75	56,90	53,40	48,10	
208,33	59,20	66,90	52,70	54,20	47,10	
259,33	55,90	66,00	53,40	54,40	46,10	
332,83	53,70	61,10	52,00	52,60	51,40	
382,33	56,80	49,50	49,10	56,80	58,20	
495,83	58,50	44,50	54,10	58,70	54,50	
551,83	64,60	57,80	46,20	54,40	52,70	
663,83	64,90	43,90	54,30	60,10	51,40	

5.6. Toxicidad de Tensioactivos

En las siguientes tablas se muestran los resultados experimentales que se han obtenido en los ensayos de toxicidad realizados sobre las muestras de los ensayos de ozonización.

5.6.1. Toxicidad del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.24. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar

EXPERIMENTO T-1.0B15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	912,3	1102,0	0,00%
B2	0,98	947,2	1036,0	9,45%
B3	1,95	928,8	996,2	11,21%
B4	3,91	930,3	810,1	27,91%
B5	7,81	911,4	632,9	42,51%
B6	15,63	905,8	416,3	61,95%
B7	31,25	885,6	238,7	77,69%
B8	62,50	927,5	86,7	92,26%
B9	125,00	927,7	4,2	99,63%
B10	250,00	964,9	1,1	99,90%
fc	1,20793			

Tabla 5.24. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar

EXPERIMENTO T-1.0C15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	927,5	1160,0	0,00%
C2	0,98	977,5	1080,0	11,66%
C3	1,95	1121,0	1216,0	13,27%
C4	3,91	912,0	833,9	26,89%
C5	7,81	921,1	638,5	44,57%
C6	15,63	914,3	442,8	61,28%
C7	31,25	930,6	256,3	77,98%
C8	62,50	918,3	77,8	93,23%
C9	125,00	887,4	6,2	99,44%
C10	250,00	960,9	1,4	99,89%
fc	1,25067			

Tabla 5.25. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar

EXPERIMENTO T-1.0B30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	912,3	1127,0	0,00%
B2	0,98	947,2	1079,0	7,79%
B3	1,95	928,8	1036,0	9,71%
B4	3,91	930,3	850,6	25,99%
B5	7,81	911,4	680,9	39,52%
B6	15,63	905,8	453,5	59,47%
B7	31,25	885,6	263,3	75,93%
B8	62,50	927,5	83,6	92,71%
B9	125,00	927,7	4,9	99,57%
B10	250,00	964,9	1,1	99,91%
fc	1,23534			

Tabla 5.25. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar

EXPERIMENTO T-1.0C30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	927,5	1180,0	0,00%
C2	0,98	977,5	1144,0	8,01%
C3	1,95	1121,0	1251,0	12,28%
C4	3,91	912,0	880,8	24,09%
C5	7,81	921,1	678,5	42,10%
C6	15,63	914,3	472,2	59,41%
C7	31,25	930,6	287,3	75,73%
C8	62,50	918,3	79,3	93,21%
C9	125,00	887,4	4,9	99,57%
C10	250,00	960,9	1,3	99,90%
fc	1,27224			

Tabla 5.26. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-1.1B15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	848,0	1114,0	0,00%
B2	512	801,8	962,4	8,63%
B3	256	849,7	1116,0	0,02%
B4	128	807,3	968,6	8,67%
B5	64	810,7	914,6	14,12%
B6	32	845,8	945,1	14,94%
B7	16	796,6	799,9	23,56%
B8	8	806,4	799,9	24,49%
B9	4	837,9	695,2	36,84%
B10	2	793,8	366,0	64,90%
fc	1,31368			

Tabla 5.26. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-1.1C15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	806,1	910,6	0,00%
C2	512	839,4	1007,0	-6,20%
C3	256	850,5	1012,0	-5,33%
C4	128	792,9	931,8	-4,03%
C5	64	779,0	808,9	8,08%
C6	32	836,0	923,6	2,20%
C7	16	839,0	847,4	10,59%
C8	8	847,4	830,1	13,28%
C9	4	781,7	507,9	42,48%
C10	2	858,6	426,4	56,04%
fc	1,12963			

Tabla 5.27. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-1.1B30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	848,0	1146,0	0,00%
B2	512	801,8	960,0	11,40%
B3	256	849,7	1116,0	2,81%
B4	128	807,3	939,5	13,89%
B5	64	810,7	939,0	14,29%
B6	32	845,8	912,8	20,14%
B7	16	796,6	822,0	23,64%
B8	8	806,4	796,3	26,93%
B9	4	837,9	669,1	40,91%
B10	2	793,8	352,5	67,14%
fc	1,35141			

Tabla 5.27. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-1.1C30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	806,1	984,5	0,00%
C2	512	839,4	954,0	6,94%
C3	256	850,5	1024,0	1,42%
C4	128	792,9	936,3	3,31%
C5	64	779,0	854,4	10,20%
C6	32	836,0	890,5	12,78%
C7	16	839,0	864,8	15,60%
C8	8	847,4	831,4	19,67%
C9	4	781,7	509,6	46,62%
C10	2	858,6	398,0	62,05%
fc	1,22131			

Tabla 5.28. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-1.2B15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1208,0	1353,0	0,00%
B2	512	1139,0	1246,0	2,33%
B3	256	1161,0	1242,0	4,49%
B4	128	1233,0	1258,0	8,91%
B5	64	1167,0	1158,0	11,41%
B6	32	1187,0	1156,0	13,05%
B7	16	1079,0	1076,0	10,97%
B8	8	1154,0	1035,0	19,92%
B9	4	1217,0	682,4	49,94%
B10	2	1181,0	173,5	86,88%
fc	1,12003			

Tabla 5.28. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-1.2C15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1152,0	1226,0	0,00%
C2	512	1175,0	1229,0	1,72%
C3	256	1187,0	1276,0	-1,01%
C4	128	1163,0	1156,0	6,60%
C5	64	1059,0	103,0	--
C6	32	1228,0	1216,0	6,95%
C7	16	1191,0	1062,0	16,21%
C8	8	1180,0	1027,0	18,22%
C9	4	1207,0	645,4	49,76%
C10	2	1174,0	161,4	87,08%
fc	1,06424			

Tabla 5.29. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-1.2B30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1208,0	1345,0	0,00%
B2	512	1139,0	1248,0	1,59%
B3	256	1161,0	1239,0	4,15%
B4	128	1233,0	1172,0	14,63%
B5	64	1167,0	1157,0	10,96%
B6	32	1187,0	1140,0	13,74%
B7	16	1079,0	1094,0	8,94%
B8	8	1154,0	1005,0	21,78%
B9	4	1217,0	680,5	49,78%
B10	2	1181,0	248,7	81,09%
fc	1,11341			

Tabla 5.29. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-1.2C30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1152,0	1247,0	0,00%
C2	512	1175,0	1276,0	-0,32%
C3	256	1187,0	1254,0	2,40%
C4	128	1163,0	1219,0	3,17%
C5	64	1059,0	998,1	12,93%
C6	32	1228,0	1197,0	9,95%
C7	16	1191,0	1063,0	17,55%
C8	8	1180,0	937,6	26,60%
C9	4	1207,0	648,0	50,40%
C10	2	1174,0	232,0	81,74%
fc	1,08246			

Tabla 5.30. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-1.3B15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	926,3	1014,0	0,00%
B2	512	996,3	1088,0	0,24%
B3	256	850,0	888,4	4,52%
B4	128	931,5	937,2	8,09%
B5	64	912,2	899,3	9,94%
B6	32	962,2	971,4	7,78%
B7	16	923,5	882,3	12,72%
B8	8	979,9	839,3	21,76%
B9	4	953,6	577,2	44,71%
B10	2	995,5	474,6	56,45%
fc	1,09468			

Tabla 5.30. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-1.3C15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	949,1	1073,0	0,00%
C2	512	987,5	1046,0	6,31%
C3	256	942,1	952,0	10,62%
C4	128	997,4	1067,0	5,37%
C5	64	941,9	939,9	11,73%
C6	32	969,9	991,3	9,60%
C7	16	969,3	936,7	14,52%
C8	8	937,8	784,1	26,04%
C9	4	977,9	610,2	44,81%
C10	2	913,8	483,9	53,16%
fc	1,13054			

Tabla 5.31. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-1.3B30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	926,3	1084,0	0,00%
B2	512	996,3	1128,0	3,25%
B3	256	850,0	919,1	7,60%
B4	128	931,5	942,6	13,53%
B5	64	912,2	905,9	15,14%
B6	32	962,2	974,2	13,48%
B7	16	923,5	904,3	16,32%
B8	8	979,9	856,4	25,32%
B9	4	953,6	591,4	47,00%
B10	2	995,5	502,5	56,87%
fc	1,17024			

Tabla 5.31. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-1.3C30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	949,1	1082,0	0,00%
C2	512	987,5	1128,0	-0,20%
C3	256	942,1	961,7	10,46%
C4	128	997,4	1094,0	3,79%
C5	64	941,9	1008,0	6,13%
C6	32	969,9	993,2	10,18%
C7	16	969,3	989,7	10,44%
C8	8	937,8	791,1	26,00%
C9	4	977,9	623,6	44,06%
C10	2	913,8	503,2	51,70%
fc	1,14003			

Tabla 5.32. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-1.4B15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1127,0	1239,0	0,00%
B2	512	1140,0	1216,0	2,98%
B3	256	1144,0	1223,0	2,76%
B4	128	1154,0	1188,0	6,36%
B5	64	1146,0	1196,0	5,07%
B6	32	1036,0	1077,0	5,44%
B7	16	1128,0	995,6	19,72%
B8	8	1135,0	84,8	93,20%
B9	4	1118,0	232,7	81,07%
B10	2	1131,0	717,9	42,26%
fc	1,09938			

Tabla 5.32. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-1.4C15		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1163,0	1284,0	0,00%
C2	512	1112,0	1181,0	3,80%
C3	256	1190,0	1242,0	5,47%
C4	128	1149,0	1231,0	2,96%
C5	64	1137,0	1204,0	4,09%
C6	32	1180,0	1191,0	8,58%
C7	16	1192,0	1115,0	15,27%
C8	8	1188,0	128,4	90,21%
C9	4	1127,0	270,3	78,28%
C10	2	1186,0	694,3	46,98%
fc	1,10404			

Tabla 5.33. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-1.4B30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1127,0	1230,0	0,00%
B2	512	1140,0	1193,0	4,11%
B3	256	1144,0	1222,0	2,13%
B4	128	1154,0	1165,0	7,50%
B5	64	1146,0	1186,0	5,18%
B6	32	1036,0	1088,0	3,77%
B7	16	1128,0	982,3	20,21%
B8	8	1135,0	171,7	--
B9	4	1118,0	342,1	--
B10	2	1131,0	698,8	43,39%
fc	1,09139			

Tabla 5.33. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-1.4C30		Toxicidad del APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}		
Tensioactivo:	APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1163,0	1273,0	0,00%
C2	512	1112,0	1161,0	4,62%
C3	256	1190,0	1222,0	6,18%
C4	128	1149,0	1225,0	2,60%
C5	64	1137,0	1181,0	5,11%
C6	32	1180,0	1169,0	9,49%
C7	16	1192,0	1089,0	16,54%
C8	8	1188,0	221,6	--
C9	4	1127,0	381,7	--
C10	2	1186,0	698,8	46,17%
fc	1,09458			

5.6.2. Toxicidad del LAS-R₁₁₋₁₄**Tabla 5.34.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-2.0B15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	2063,0	1918,0	0,00%
B2	0,98	1965,0	1850,0	-1,27%
B3	1,95	1896,0	1771,0	-0,47%
B4	3,91	2062,0	1912,0	0,26%
B5	7,81	1946,0	1782,0	1,50%
B6	15,63	1752,0	1317,0	19,15%
B7	31,25	1799,0	409,1	75,54%
B8	62,50	1866,0	378,4	78,19%
B9	125,00	1963,0	195,0	89,32%
B10	250,00	1951,0	212,9	88,26%
fc	0,92971			

Tabla 5.34. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-2.0C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	2030,0	1945,0	0,00%
C2	0,98	2120,0	2023,0	0,41%
C3	1,95	2047,0	1923,0	1,95%
C4	3,91	1991,0	1891,0	0,87%
C5	7,81	1959,0	1785,0	4,90%
C6	15,63	1995,0	1751,0	8,39%
C7	31,25	1880,0	590,8	67,20%
C8	62,50	1939,0	275,8	85,15%
C9	125,00	2006,0	230,7	88,00%
C10	250,00	1976,0	84,3	95,55%
fc	0,95813			

Tabla 5.35. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-2.0B30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	2063,0	1797,0	0,00%
B2	0,98	1965,0	1769,0	-3,35%
B3	1,95	1896,0	1724,0	-4,39%
B4	3,91	2062,0	1971,0	-9,74%
B5	7,81	1946,0	1774,0	-4,66%
B6	15,63	1752,0	1162,0	23,86%
B7	31,25	1799,0	395,2	74,78%
B8	62,50	1866,0	356,5	78,07%
B9	125,00	1963,0	171,7	89,96%
B10	250,00	1951,0	177,6	89,55%
fc	0,87106			

Tabla 5.35. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-2.0C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	250	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	2030,0	1820,0	0,00%
C2	0,98	2120,0	2101,0	-10,54%
C3	1,95	2047,0	1958,0	-6,69%
C4	3,91	1991,0	1987,0	-11,31%
C5	7,81	1959,0	1781,0	-1,40%
C6	15,63	1995,0	1689,0	5,57%
C7	31,25	1880,0	479,1	71,58%
C8	62,50	1939,0	256,8	85,23%
C9	125,00	2006,0	216,4	87,97%
C10	250,00	1976,0	70,6	96,02%
fc	0,89655			

Tabla 5.36. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-2.1B15 y T-2.1C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	921,0	984,7	0,00%
B2	16	927,2	939,8	5,20%
B3	8	987,3	891,1	15,58%
B4	4	966,9	748,9	27,56%
B5	2	973,1	513,6	50,63%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	921,0	984,7	0,00%
C2	32	1024,0	1062,0	3,00%
C3	16	986,1	1003,0	4,87%
C4	8	980,6	882,3	15,84%
C5	4	974,9	776,6	25,49%
C6	2	948,2	537,8	46,95%
fc	1,06916			

Tabla 5.37. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-2.1B30 y T-2.1C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	921,0	996,7	0,00%
B2	16	927,2	932,1	7,11%
B3	8	987,3	922,5	13,66%
B4	4	966,9	781,5	25,31%
B5	2	973,1	528,8	49,79%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	921,0	996,7	0,00%
C2	32	1024,0	1090,0	1,64%
C3	16	986,1	996,7	6,60%
C4	8	980,6	921,2	13,19%
C5	4	974,9	804,6	23,74%
C6	2	948,2	527,4	48,60%
fc	1,08219			

Tabla 5.38. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-2.2B15 y T-2.2C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	998,5	1034,0	0,00%
B2	16	935,3	946,2	2,31%
B3	8	982,3	898,4	11,68%
B4	4	971,7	772,6	23,22%
B5	2	969,2	502,1	49,97%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	998,5	1034,0	0,00%
C2	32	964,9	1014,0	-1,48%
C3	16	949,1	979,5	0,34%
C4	8	922,1	868,3	9,07%
C5	4	962,8	777,2	22,05%
C6	2	1006,0	537,6	48,40%
fc	1,03555			

Tabla 5.39. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-2.2B30 y T-2.2C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	998,5	1025,0	0,00%
B2	16	935,3	934,6	2,66%
B3	8	982,3	904,0	10,35%
B4	4	971,7	807,0	19,10%
B5	2	969,2	526,4	47,09%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	998,5	1025,0	0,00%
C2	32	964,9	998,5	-0,81%
C3	16	949,1	1010,0	-3,67%
C4	8	922,1	870,7	8,02%
C5	4	962,8	790,6	20,01%
C6	2	1006,0	560,8	45,70%
fc	1,02654			

Tabla 5.40. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-2.3B15 y T-2.3C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	717,5	721,8	0,00%
B2	16	733,5	737,8	0,01%
B3	8	739,5	692,5	6,91%
B4	4	722,4	584,3	19,60%
B5	2	716,0	386,4	46,36%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	717,5	721,8	0,00%
C2	32	781,2	765,9	2,54%
C3	16	754,1	765,5	-0,91%
C4	8	704,6	681,3	3,88%
C5	4	737,6	583,7	21,34%
C6	2	754,6	386,4	49,10%
fc	1,00599			

Tabla 5.41. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 15 minutos

EXPERIMENTO T-2.3B30 y T-2.3C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	15	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	717,5	720,1	0,00%
B2	16	733,5	738,6	-0,33%
B3	8	739,5	677,2	8,76%
B4	4	722,4	612,9	15,46%
B5	2	716,0	387,8	46,03%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	717,5	720,1	0,00%
C2	32	781,2	786,1	-0,26%
C3	16	754,1	755,6	0,16%
C4	8	704,6	705,5	0,23%
C5	4	737,6	602,4	18,62%
C6	2	754,6	384,0	49,30%
fc	1,00362			

Tabla 5.42. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 20 minutos

EXPERIMENTO T-2.4B15 y T-2.4C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	20	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1247,0	1390,0	0,00%
B2	16	1219,0	1245,0	8,37%
B3	8	1198,0	1120,0	16,13%
B4	4	1218,0	925,6	31,82%
B5	2	1216,0	658,0	51,46%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1247,0	1390,0	0,00%
C2	32	1259,0	1369,0	2,45%
C3	16	1319,0	1322,0	10,08%
C4	8	1273,0	1147,0	19,17%
C5	4	1293,0	1008,0	30,06%
C6	2	1299,0	701,0	51,59%
fc	1,11467			

Tabla 5.43. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 20 minutos

EXPERIMENTO T-2.4B30 y T-2.4C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	20	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1247,0	1411,0	0,00%
B2	16	1219,0	1265,0	8,29%
B3	8	1198,0	1164,0	14,13%
B4	4	1218,0	1005,0	27,08%
B5	2	1216,0	654,2	52,45%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1247,0	1411,0	0,00%
C2	32	1259,0	1431,0	-0,45%
C3	16	1319,0	1366,0	8,47%
C4	8	1273,0	1214,0	15,72%
C5	4	1293,0	1068,0	27,00%
C6	2	1299,0	715,0	51,36%
fc	1,13151			

Tabla 5.44. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-2.5B15 y T-2.5C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	717,5	758,1	0,00%
B2	16	712,8	690,1	8,37%
B3	8	723,8	608,3	20,46%
B4	4	743,0	312,6	60,18%
B5	2	761,2	388,2	51,73%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	717,5	758,1	0,00%
C2	32	702,6	715,0	3,69%
C3	16	720,9	693,5	8,95%
C4	8	759,7	629,2	21,61%
C5	4	735,2	1050,0	-35,17%
C6	2	760,3	369,2	54,04%
fc	1,05658			

Tabla 5.45. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-2.5B30 y T-2.5C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	717,5	740,2	0,00%
B2	16	712,8	662,1	9,96%
B3	8	723,8	606,2	18,82%
B4	4	743,0	327,3	57,30%
B5	2	761,2	411,3	47,62%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	717,5	740,2	0,00%
C2	32	702,6	690,5	4,74%
C3	16	720,9	670,9	9,79%
C4	8	759,7	607,8	22,45%
C5	4	--	--	--
C6	2	760,3	395,4	49,59%
fc	1,03164			

Tabla 5.46. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-2.6B15 y T-2.6C15		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1250,0	1358,0	0,00%
B2	16	1056,0	994,6	13,30%
B3	8	1206,0	1121,0	14,44%
B4	4	1231,0	902,6	32,51%
B5	2	1329,0	723,4	49,90%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1250,0	1358,0	0,00%
C2	32	1187,0	1197,0	7,18%
C3	16	1274,0	1304,0	5,79%
C4	8	1304,0	1148,0	18,96%
C5	4	1297,0	1014,0	28,04%
C6	2	1267,0	718,9	47,77%
fc	1,0864			

Tabla 5.47. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-2.6B30 y T-2.6C30		Toxicidad del LAS-R ₁₁₋₁₄		
Tensioactivo:	LAS-R ₁₁₋₁₄			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1250,0	1357,0	0,00%
B2	16	1056,0	1040,0	9,28%
B3	8	1206,0	1187,0	9,34%
B4	4	1231,0	964,7	27,81%
B5	2	1329,0	721,5	49,99%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1250,0	1357,0	0,00%
C2	32	1187,0	1217,0	5,56%
C3	16	1274,0	1315,0	4,92%
C4	8	1304,0	1194,0	15,66%
C5	4	1297,0	1085,0	22,94%
C6	2	1267,0	702,9	48,90%
fc	1,0856			

5.6.3. Toxicidad del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁**Tabla 5.48.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-3.0B15 y T-3.0C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	---			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	1095,0	1173,0	0,00%
B2	5	1128,0	976,7	19,17%
B3	10	1194,0	791,8	38,09%
B4	20	1184,0	412,4	67,49%
B5	40	1211,0	146,3	88,72%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	1095,0	1173,0	0,00%
C2	2,5	1190,0	1098,0	13,87%
C3	5	1148,0	957,1	22,17%
C4	10	1148,0	743,5	39,54%
C5	20	1161,0	462,3	62,83%
C6	40	1305,0	90,2	93,55%
fc	1,07123			

Tabla 5.49. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-3.0B30 y T-3.0C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
% de O₃ :	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/L	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	1095,0	1203,0	0,00%
B2	5	1128,0	1064,0	14,14%
B3	10	1194,0	929,4	29,15%
B4	20	1184,0	503,8	61,27%
B5	40	1211,0	169,1	87,29%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	1095,0	1203,0	0,00%
C2	2,5	1190,0	1173,0	10,28%
C3	5	1148,0	1029,0	18,41%
C4	10	1148,0	863,8	31,51%
C5	20	1161,0	561,6	55,97%
C6	40	1305,0	98,7	93,11%
fc	1,07123			

Tabla 5.50. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 2,5 minutos

EXPERIMENTO T-3.1B15 y T-3.1C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	2,5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1153,0	1332,0	0,00%
B2	16	1128,0	860,0	34,00%
B3	8	1193,0	625,1	54,64%
B4	4	1058,0	371,4	69,61%
B5	2	1185,0	145,6	89,36%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1153,0	1332,0	0,00%
C2	32	1136,0	1039,0	20,83%
C3	16	1202,0	727,1	47,64%
C4	8	1186,0	668,2	51,23%
C5	4	1200,0	389,9	71,87%
C6	2	1226,0	148,7	89,50%
fc	1,15525			

Tabla 5.51. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 2,5 minutos

EXPERIMENTO T-3.1B30 y T-3.1C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	2,5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1153,0	1332,0	0,00%
B2	16	1128,0	1064,0	18,35%
B3	8	1193,0	769,2	44,19%
B4	4	1058,0	449,8	63,20%
B5	2	1185,0	154,1	88,74%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1153,0	1332,0	0,00%
C2	32	1136,0	1118,0	14,81%
C3	16	1202,0	715,2	48,50%
C4	8	1186,0	798,4	41,73%
C5	4	1200,0	498,4	64,05%
C6	2	1226,0	168,7	88,09%
fc	1,15525			

Tabla 5.52. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-3.2B15 y T-3.2C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃ :	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1314,0	1487,0	0,00%
B2	16	1226,0	945,1	31,88%
B3	8	1393,0	--	--
B4	4	1349,0	390,2	74,44%
B5	2	1295,0	163,7	88,83%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1314,0	1487,0	0,00%
C2	32	1400,0	1208,0	23,75%
C3	16	1319,0	946,0	36,62%
C4	8	1466,0	739,1	55,45%
C5	4	1462,0	393,4	76,22%
C6	2	1368,0	163,7	89,43%
fc	1,13166			

Tabla 5.53. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-3.2B30 y T-3.2C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃ :	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1314,0	1487,0	0,00%
B2	16	1226,0	945,1	31,88%
B3	8	1393,0	--	--
B4	4	1349,0	390,2	74,44%
B5	2	1295,0	163,7	88,83%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1314,0	1487,0	0,00%
C2	32	1400,0	1208,0	23,75%
C3	16	1319,0	946,0	36,62%
C4	8	1466,0	739,1	55,45%
C5	4	1462,0	393,4	76,22%
C6	2	1368,0	163,7	89,43%
fc	1,13166			

Tabla 5.54. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-3.3B15 y T-3.3C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1320,0	1333,0	0,00%
B2	16	1223,0	982,0	20,49%
B3	8	1259,0	646,8	49,13%
B4	4	1307,0	404,5	69,35%
B5	2	1387,0	169,7	87,88%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1320,0	1333,0	0,00%
C2	32	1362,0	1204,0	12,46%
C3	16	1327,0	939,4	29,90%
C4	8	1372,0	733,5	47,06%
C5	4	1382,0	392,1	71,90%
fc	1,13166			

Tabla 5.55. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-3.3B30 y T-3.3C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	1320,0	1333,0	0,00%
B2	16	1223,0	1001,0	18,95%
B3	8	1259,0	640,0	49,66%
B4	4	1307,0	395,1	70,07%
B5	2	1387,0	155,6	88,89%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	1320,0	1333,0	0,00%
C2	32	1362,0	1234,0	10,28%
C3	16	1327,0	929,3	30,65%
C4	8	1372,0	730,4	47,28%
C5	4	1382,0	379,4	72,81%
C6	2	--	--	--
fc	1,009			

Tabla 5.56. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-3.4B15 y T-3.4C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	605,7	626,7	0,00%
B2	16	606,6	424,5	32,36%
B3	8	565,8	343,6	41,31%
B4	4	585,8	181,3	70,09%
B5	2	593,4	89,5	85,42%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	605,7	626,7	0,00%
C2	32	588,7	528,9	13,17%
C3	16	605,0	451,3	27,90%
C4	8	596,2	363,6	41,06%
C5	4	607,3	199,0	68,33%
C6	2	586,2	86,0	85,82%
fc	1,03467			

Tabla 5.57. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 25 minutos

EXPERIMENTO T-3.4B30 y T-3.4C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	25	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	605,7	634,1	0,00%
B2	16	606,6	467,3	26,41%
B3	8	565,8	404,9	31,64%
B4	4	585,8	218,1	64,44%
B5	2	593,4	64,4	89,63%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	605,7	634,1	0,00%
C2	32	588,7	549,9	10,77%
C3	16	605,0	520,7	17,79%
C4	8	596,2	422,3	32,34%
C5	4	607,3	237,4	62,66%
C6	2	586,2	62,2	89,86%
fc	1,04689			

Tabla 5.58. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-3.5B15 y T-3.5C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃ :	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	566,1	594,5	0,00%
B2	16	603,9	445,7	29,72%
B3	8	631,5	361,1	45,55%
B4	4	620,5	212,2	67,44%
B5	2	625,3	133,0	79,75%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	566,1	594,5	0,00%
C2	32	610,9	567,1	11,60%
C3	16	614,9	475,6	26,35%
C4	8	649,9	374,7	45,10%
C5	4	612,3	190,6	70,36%
C6	2	603,3	124,3	80,38%
fc	1,05017			

Tabla 5.59. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-3.5B30 y T-3.5C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
% de O₃:	75			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	566,1	619,7	0,00%
B2	16	603,9	528,4	20,07%
B3	8	631,5	433,1	37,35%
B4	4	620,5	205,0	69,82%
B5	2	625,3	112,6	83,55%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	566,1	619,7	0,00%
C2	32	610,9	587,6	12,13%
C3	16	614,9	562,7	16,40%
C4	8	649,9	450,3	36,71%
C5	4	612,3	170,4	74,58%
C6	2	603,3	105,1	84,09%
fc	1,09468			

5.6.4. Toxicidad del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀**Tabla 5.60.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-4.0B15		Toxicidad del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	517,6	679,5	0,00%
B2	0,98	489,2	633,2	1,40%
B3	1,95	502,6	613,2	7,06%
B4	3,91	517,7	549,5	19,15%
B5	7,81	516,9	380,0	44,00%
B6	15,63	519,8	239,4	64,92%
B7	31,25	534,0	134,1	80,87%
B8	62,50	511,7	85,0	87,35%
B9	125,00	525,1	44,0	93,62%
B10	250,00	545,8	20,7	97,11%
fc	1,31278			

Tabla 5.60. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-4.0C15		Toxicidad del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	483,9	660,9	0,00%
C2	0,98	505,9	649,8	5,96%
C3	1,95	533,3	621,6	14,66%
C4	3,91	538,3	569,1	22,59%
C5	7,81	523,5	413,4	42,18%
C6	15,63	540,7	241,3	67,32%
C7	31,25	530,1	148,1	79,54%
C8	62,50	523,9	92,0	87,14%
C9	125,00	562,7	50,5	93,43%
C10	250,00	575,6	20,0	97,46%
fc	1,36577			

Tabla 5.61. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-4.0B30		Toxicidad del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	CONTROL	517,6	681,6	0,00%
B2	0,98	489,2	603,5	6,32%
B3	1,95	502,6	582,7	11,96%
B4	3,91	517,7	569,0	16,54%
B5	7,81	516,9	405,3	40,46%
B6	15,63	519,8	256,9	62,47%
B7	31,25	534,0	163,9	76,69%
B8	62,50	511,7	100,4	85,10%
B9	125,00	525,1	49,3	92,87%
B10	250,00	545,8	21,0	97,09%
fc	1,31685			

Tabla 5.61. (Continuación) Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar

EXPERIMENTO T-4.0C30		Toxicidad del EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	500	Temperatura, °C:	--	
Tiempo de O₃, min:	--	Caudal de O₃, Ln/h :	--	
Concentración O₃, g/Nm³	--			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Concentración, mg/l	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	CONTROL	483,9	628,5	0,00%
C2	0,98	505,9	636,5	3,13%
C3	1,95	533,3	585,8	15,43%
C4	3,91	538,3	530,2	24,17%
C5	7,81	523,5	456,8	32,82%
C6	15,63	540,7	264,3	62,37%
C7	31,25	530,1	171,4	75,11%
C8	62,50	523,9	106,4	84,36%
C9	125,00	562,7	57,3	92,16%
C10	250,00	575,6	21,2	97,17%
fc	1,29882			

Tabla 5.62. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 2,5 minutos

EXPERIMENTO T-3.1B15 y T-3.1C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	2,5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	725,6	719,9	0,00%
B2	16	762,4	496,7	34,33%
B3	8	730,9	378,4	47,82%
B4	4	661,0	237,7	63,75%
B5	2	666,4	136,4	79,37%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	725,6	719,9	0,00%
C2	32	712,9	572,2	19,10%
C3	16	632,4	438,2	30,16%
C4	8	684,3	365,8	46,12%
C5	4	433,8	176,2	59,06%
C6	2	607,0	125,6	79,14%
fc	0,9921			

Tabla 5.63. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 2,5 minutos

EXPERIMENTO T-3.1B30 y T-3.1C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	2,5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	725,6	707,7	0,00%
B2	16	762,4	521,9	29,81%
B3	8	730,9	422,7	40,70%
B4	4	661,0	287,3	55,44%
B5	2	666,4	157,8	75,72%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	725,6	707,7	0,00%
C2	32	712,9	576,6	17,07%
C3	16	632,4	464,9	24,63%
C4	8	684,3	419,6	37,13%
C5	4	433,8	201,2	52,45%
C6	2	607,0	139,2	76,49%
fc	0,9753			

Tabla 5.64. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-3.2B15 y T-3.2C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	466,7	485,0	0,00%
B2	16	522,4	317,1	41,59%
B3	8	476,6	223,2	54,94%
B4	4	514,2	148,8	72,15%
B5	2	575,5	85,1	85,77%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	466,7	485,0	0,00%
C2	32	576,9	417,2	30,41%
C3	16	498,9	316,3	38,99%
C4	8	486,0	231,8	54,10%
C5	4	485,5	154,4	69,40%
C6	2	430,0	79,8	82,15%
fc	1,039			

Tabla 5.65. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 5 minutos

EXPERIMENTO T-3.2B30 y T-3.2C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	5	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	466,7	492,3	0,00%
B2	16	522,4	343,2	37,72%
B3	8	476,6	256,9	48,90%
B4	4	514,2	164,5	69,67%
B5	2	575,5	76,4	87,42%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	466,7	492,3	0,00%
C2	32	576,9	419,0	31,15%
C3	16	498,9	331,8	36,95%
C4	8	486,0	262,5	48,80%
C5	4	485,5	174,0	66,02%
C6	2	430,0	68,7	84,86%
fc	1,0548			

Tabla 5.66. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-3.3B15 y T-3.3C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	726,8	733,7	0,00%
B2	16	741,2	495,4	33,79%
B3	8	723,2	363,9	50,16%
B4	4	726,4	245,9	66,47%
B5	2	742,1	148,2	80,22%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	726,8	733,7	0,00%
C2	32	597,4	458,1	24,04%
C3	16	752,6	527,3	30,60%
C4	8	727,2	402,6	45,16%
C5	4	774,6	267,8	65,75%
fc	1,009			

Tabla 5.67. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 10 minutos

EXPERIMENTO T-3.3B30 y T-3.3C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	10	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	726,8	748,0	0,00%
B2	16	741,2	561,1	26,44%
B3	8	723,2	448,6	39,73%
B4	4	726,4	321,4	57,01%
B5	2	742,1	168,1	77,99%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	726,8	748,0	0,00%
C2	32	597,4	491,8	20,01%
C3	16	752,6	561,5	27,51%
C4	8	727,2	474,1	36,65%
C5	4	774,6	348,6	56,27%
C6	2	634,6	145,4	77,74%
fc	1,029			

Tabla 5.68. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-3.5B15 y T-3.5C15		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	15			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	531,9	524,0	0,00%
B2	16	527,9	363,3	30,14%
B3	8	517,6	251,3	50,72%
B4	4	525,7	157,0	69,68%
B5	2	511,1	83,1	83,49%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	531,9	524,0	0,00%
C2	32	553,1	418,7	23,16%
C3	16	601,4	386,4	34,78%
C4	8	568,1	274,0	51,04%
C5	4	578,8	172,5	69,75%
C6	2	538,9	91,5	82,77%
fc	0,9851			

Tabla 5.69. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 30 minutos

EXPERIMENTO T-3.5B30 y T-3.5C30		Toxicidad del FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁		
Tensioactivo:	EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀			
Ensayo de Toxicidad:	Inhibición del crecimiento de <i>Vibrio fischeri</i>			
Condiciones del ensayo de inhibición				
Tiempo de incubación, min.:	30			
Condiciones de ozonización				
Concentración inicial, mg/L:	80	Temperatura, °C:	25	
Tiempo de O₃, min:	30	Caudal de O₃, Ln/h :	5	
Concentración O₃, g/Nm³	113			
Resultados experimentales Replica 1				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
B1	∞	531,9	561,3	0,00%
B2	16	527,9	392,7	29,51%
B3	8	517,6	293,0	46,36%
B4	4	525,7	173,3	68,76%
B5	2	511,1	66,2	87,73%
Resultados experimentales Replica 2				
TEST	Factor de dilución	I ₀	I _T	% Inhibición
C1	∞	531,9	561,3	0,00%
C2	32	553,1	433,9	25,66%
C3	16	601,4	415,5	34,53%
C4	8	568,1	310,0	48,29%
C5	4	578,8	189,9	68,91%
C6	2	538,9	68,7	87,92%
fc	1,055			

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

6.1. Desarrollo de métodos de análisis para la determinación de la concentración de tensioactivos.

6.1.1 Método simplificado de análisis para la determinación del LAS-R₁₁₋₁₄ como tensioactivo aniónico (MBAS).

La recta de calibración se realizó, según el método descrito en el apartado 4.3.1.1., como puede verse en la figura 6.1

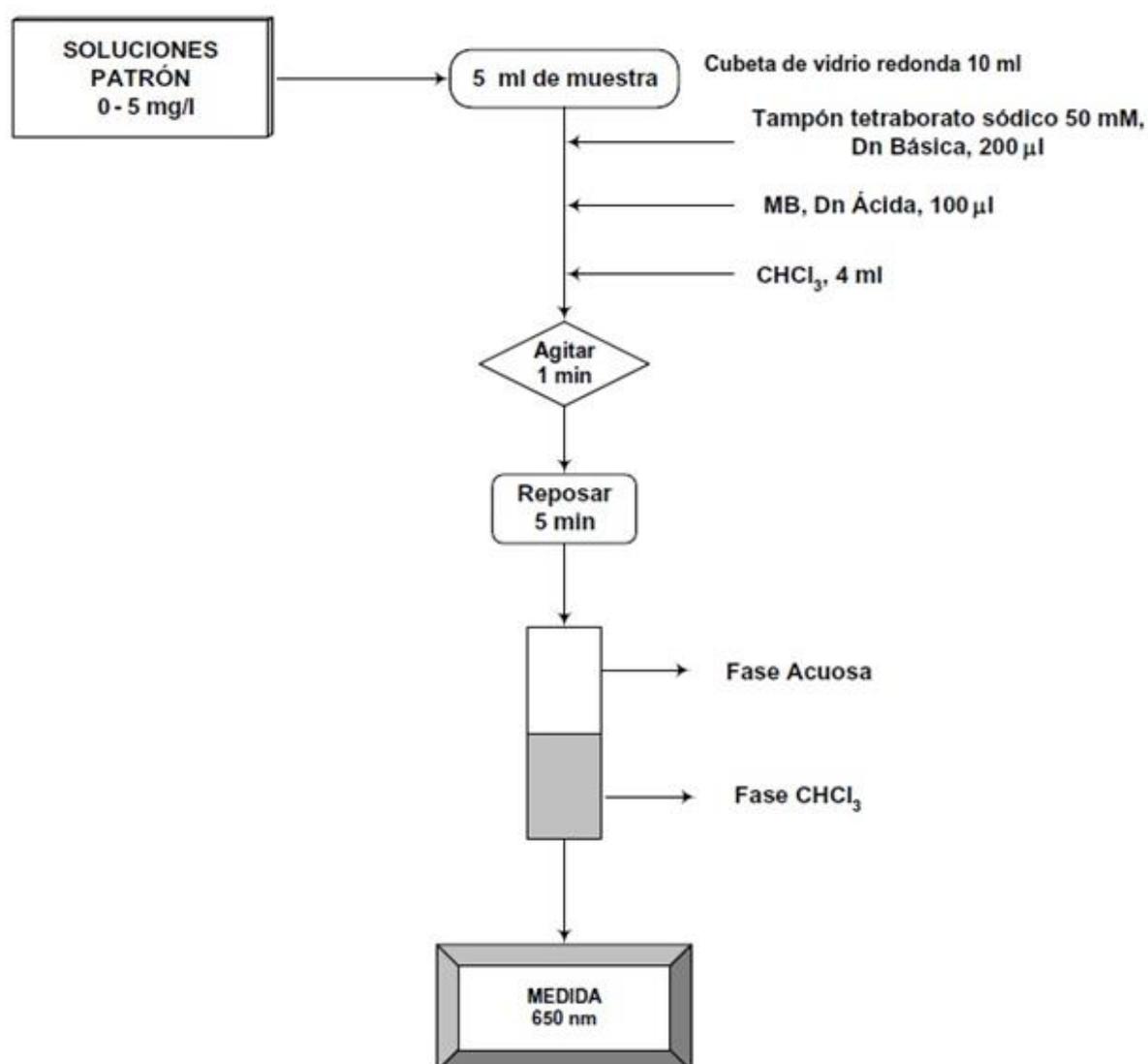


Figura 6.1. Procedimiento analítico simplificado para la determinación de tensioactivos aniónicos.
(Lechuga, 2005)

Los parámetros de calidad del método analítico propuesto se han calculado a partir de rectas de calibrado obtenidas en el rango de concentración de tensioactivo comprendido entre 0 y 5 mg/L. En la figura 6.2 se muestran, a título de ejemplo, los valores de absorbancia medidos a 650 nm frente a un blanco con cloroformo a distintas concentraciones de tensioactivo.

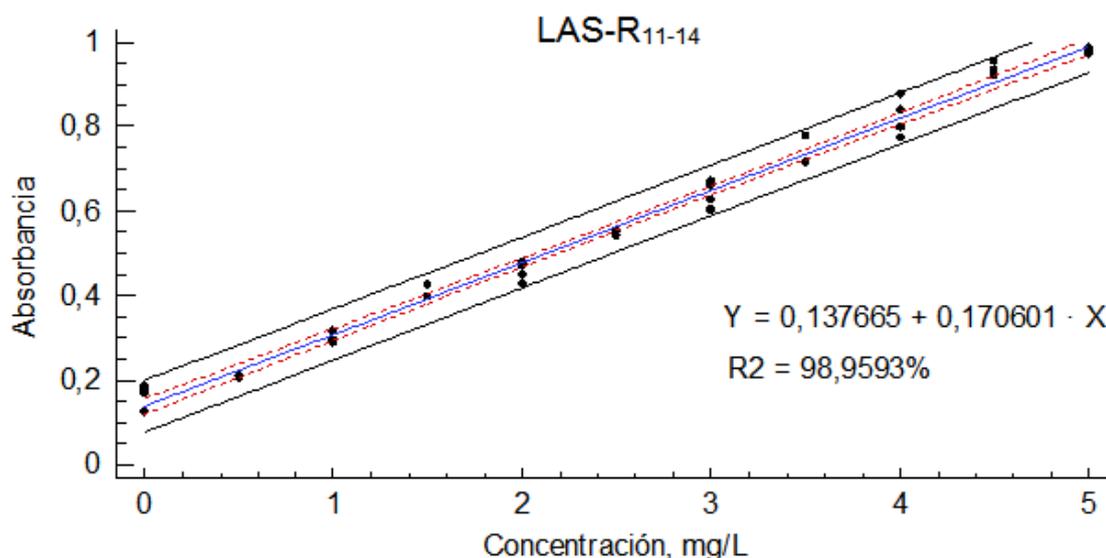


Figura 6.2. Recta de calibrado obtenida para el LAS-R₁₁₋₁₄ utilizando el método simplificado de las sustancias activas al azul de metileno

Para las rectas de calibración (Figura 6.2) se ensaya un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS) que minimiza la distancia de los residuos a la recta de regresión. La curva de calibración se muestra en la Figura 6.2 y los parámetros del análisis de regresión: desviación estándar de la ordenada en el origen S_a , de la pendiente S_b , de regresión S_r , el coeficiente de correlación r y el coeficiente de determinación R^2 ; se muestran en la tabla 6.1. “a” es la ordenada en el origen y “b” la pendiente de la recta de regresión.

Tabla 6.1. Parámetros del análisis de regresión para el LAS-R₁₁₋₁₄

a	0,1377
b	0,1706
S_a	0,009152
S_b	0,003092
S_r	0,02897
r	0,9948
R^2	98,9593%

El valor-P de la ANOVA es menor que 0,05 ($P=0,0000$), por lo que hay una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica el 98,9593% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,9948, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar para los residuos es de 0,02897.

El modelo de regresión OLS solo es aplicable si los datos de partida cumplen una serie de requisitos previos tales como: aleatoriedad e independencia de la variable de respuesta, normalidad de la variable de respuesta, ausencia de errores aleatorios en la variable independiente, linealidad e igualdad de varianzas u homocedasticidad. Generalmente se asumen como ciertos los tres primeros y sólo se comprueban la linealidad y la homocedasticidad.

Linealidad y homocedasticidad

La linealidad “in line” describe la ausencia de curvatura en la línea de calibración. La prueba de falta o carencia de ajuste (Lack of Fit) esta diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si debería usarse un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad del modelo actual contra la variabilidad entre observaciones a valores replicados de la variable independiente X. Dado que el valor-P para la falta de ajuste es mayor o igual que 0,05 ($P_{LOF}=0,1523$), el modelo parece ser adecuado para los datos observados no habiendo una diferencia estadísticamente significativa.

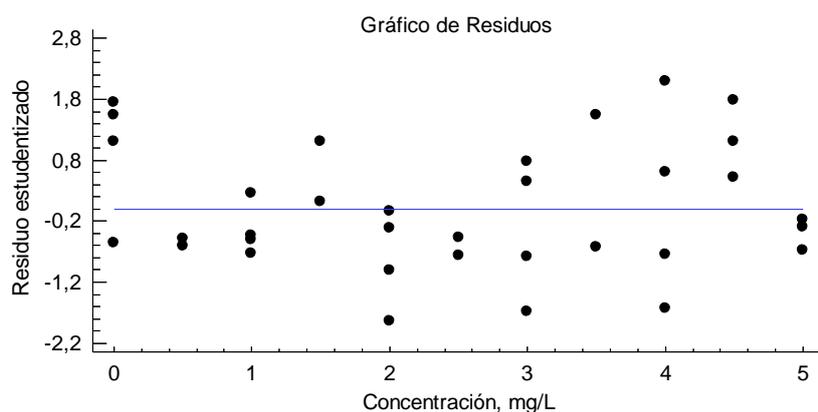


Figura 6.3. Grafico de residuales la recta de calibración del LAS-R₁₁₋₁₄

La linealidad “on-line” mide la dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración y determina el rango de valores para los cuales se cumple que existe una relación lineal entre la señal y la concentración. La linealidad “on-line” se puede evaluar a partir del coeficiente de determinación R^2 , la desviación estándar relativa de la pendiente (S_b/b) y a partir de la expresión:

$$\text{LIN}_{\text{OL}}(\%) = \left(1 - \frac{S_b}{b}\right) \cdot 100 \quad [6.1]$$

Los valores obtenidos para estos parámetros son, respectivamente: 98,9593; 0,01812 y $\text{LIN}_{\text{OL}}(\%)=98,1876$

La curva de calibración obtenida en función de la concentración viene dada por la ecuación:

$$A_{650} = 0,137665 + 0,170601 \cdot [\text{LAS} - R_{11-14}] \quad [6.2]$$

Sensibilidad

Hay dos formas de expresar la sensibilidad de un método analítico: la sensibilidad de calibración (SENS_{cal}) que mide la relación entre la señal instrumental y la concentración de analito y la sensibilidad analítica ($\text{SENS}_{\text{anal}}$) que es la menor diferencia de concentración que un método analítico puede discernir (a la sensibilidad analítica también se le conoce con el nombre de resolución). La primera se evalúa a partir de la pendiente de calibración (b) y a la segunda a partir de cociente S_r/m . Los valores obtenidos para la sensibilidad son:

$$\text{SENS}_{\text{cal}} = b = 0,1706 \frac{\text{unidades de absorbancia}}{\text{mg/L}} \quad [6.3]$$

$$\text{SENS}_{\text{anal}} = \frac{S_r}{b} = 0,1698 \text{ mg/L} \quad [6.4]$$

Que indican, respectivamente, que un incremento de la concentración de 1 mg/L supone un aumento de la señal analítica de 0,1706 unidades y que el método distingue cambios de concentración de 0,1698 mg/L.

Precisión

La precisión mide el grado de incertidumbre de un resultado analítico. Es debida a la dispersión de la señal del instrumento y al uso de valores de la pendiente y la ordenada en el origen estimados a partir de la recta de calibración para transformar la señal instrumenta medida en concentración.

Matemáticamente se expresa por la desviación estándar relativa de la concentración (S_c/c) y tiene un valor distinto a cada concentración. A partir de los datos de calibrado se puede obtener S_c para cada concentración a partir de la expresión:

$$S_c = \sqrt{\left(\frac{S_r}{b}\right)^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{m}\right) + \left(\frac{S_b}{c}\right)^2 (c - \bar{c})} \quad [6.5]$$

Donde n es el número de puntos de la recta de calibrado, m el número de replicas, c la concentración de tensioactivo y \bar{c} la concentración media de tensioactivo en el intervalo de concentraciones considerado. En la tabla 6.2 se muestran los valores de S_c para cada valor de concentración.

Tabla 6.2. Valores de precisión obtenidos en el rango de valores de 0 a 5 mg/L

Concentración mg/L	S_c	S_c/c
0,0	0,09491	--
0,5	0,12799	0,25598
1,0	0,09663	0,09663
1,5	0,12927	0,08618
2,0	0,09831	0,04916
2,5	0,13053	0,05221
3,0	0,09997	0,03332
3,5	0,13178	0,03765
4,0	0,10160	0,02540
4,5	0,11353	0,02523
5,0	0,11425	0,02285

$n = 11, \bar{c} = 2,5 \text{ mg/L}$

Limites inferiores

Límite de detección (DL)

Es la menor concentración que puede detectarse con razonable certeza por un procedimiento analítico determinado. Utilizando la aproximación de la IUPAC, el límite de detección se calcula a partir de la expresión:

$$DL = 3 \cdot S_{c0} \quad [6.6]$$

El valor obtenido para el límite de detección es de 0,28 mg/L.

Límite de cuantificación (QL)

Representa la mínima concentración cuantificable por el método analítico. Se calcula a partir de la expresión

$$QL = 10 \cdot S_{c0} \quad [6.7]$$

El valor obtenido para el límite de cuantificación es de 0,95 mg/L.

Los parámetros de calidad obtenidos en el método simplificado de sustancias activas al azul de metileno demuestran que este procedimiento es adecuado para el análisis del LAS-R₁₁₋₁₄.

6.1.2. Método de análisis de la Antrona para APG's

La recta de calibración se realizó, según el método descrito en el apartado 4.3.1.3., como puede verse en la figura 6.4:

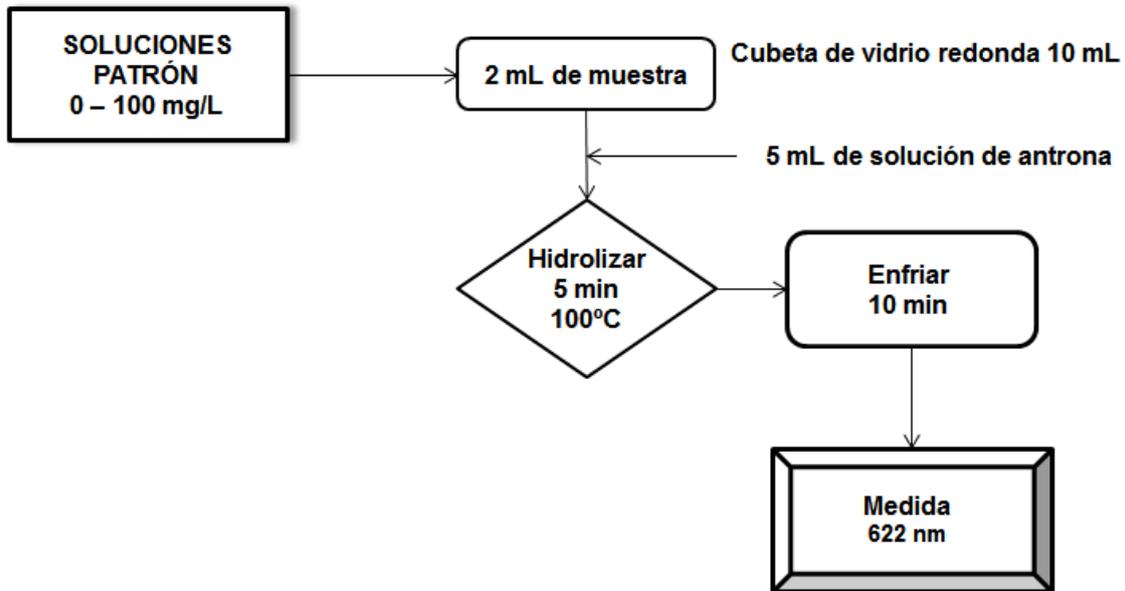


Figura 6.4. Procedimiento analítico simplificado para la determinación de APG's

Los parámetros de calidad del método analítico propuesto se han calculado a partir de rectas de calibrado obtenidas en el rango de concentración de tensioactivo comprendido entre 0 y 100 mg/L. En la figura 6.5 se muestran, a título de ejemplo, los valores de absorbancia medidos a 622 nm frente a un blanco con agua destilada a distintas concentraciones de tensioactivo.

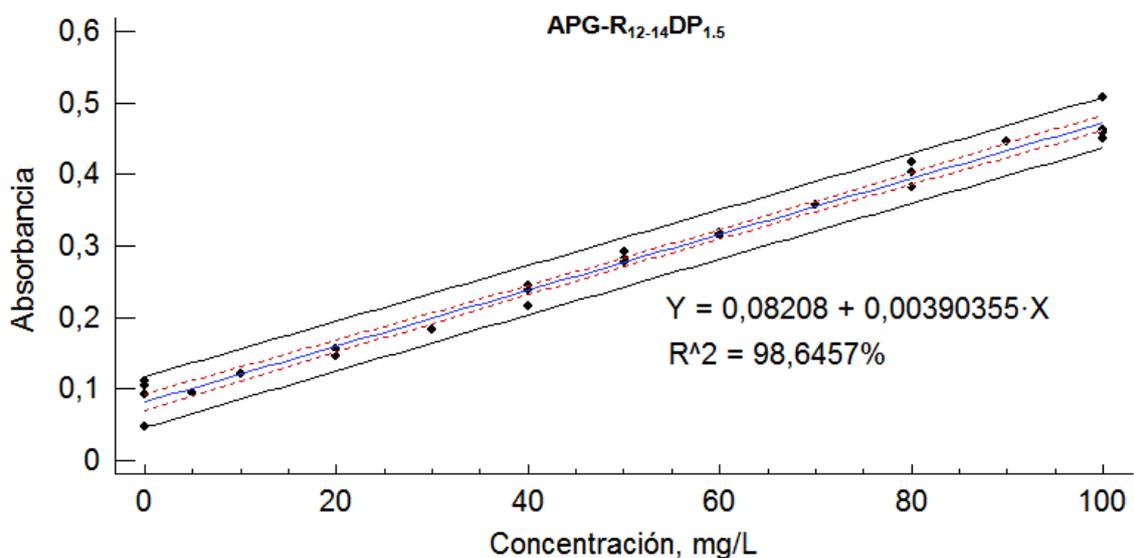


Figura 6.5. Recta de calibrado obtenida para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizando el método de la antrona.

Para las rectas de calibración (Figura 6.5) se ensaya un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Los parámetros del análisis de regresión se muestran en la tabla 6.3:

Tabla 6.3. Parámetros del análisis de regresión para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

a	0,08208
b	0,003904
S _a	0,005520
S _b	0,00008970
S _r	0,01642
r	0,9932
R ²	98,6457%

El valor-P de la ANOVA es menor que 0,05 ($P=0,0000$), por lo que hay una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica el 98,6457% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,9932, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar para los residuos es de 0,01642.

Linealidad y homocedasticidad

El valor-P para la falta de ajuste es mayor o igual que 0,05 ($P_{LOF}=0,9515$), el modelo parece ser adecuado para los datos observados no habiendo una diferencia estadísticamente significativa.

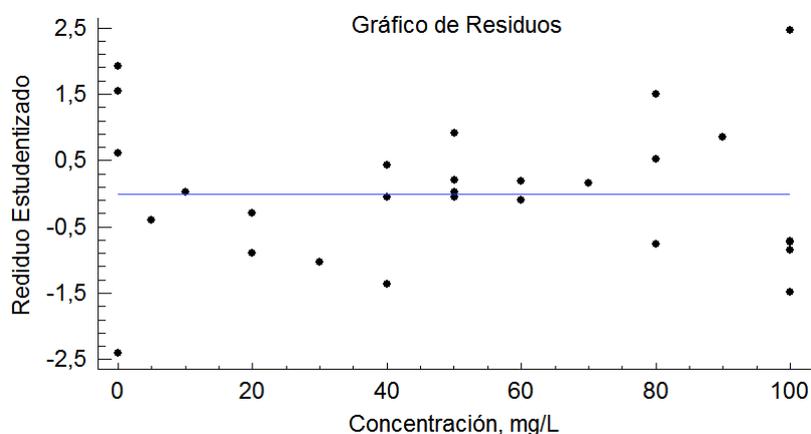


Figura 6.6. Grafico de residuales la recta de calibración del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

El error absoluto medio (MAE) es de 0,01229 siendo el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan los datos. Puesto que el valor-P ($P_{DW}=0,2098$) es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Los valores de la linealidad “on-line”, según la ecuación [6.1], obtenidos son: $R^2 = 98,9593\%$; $(S_b/b) = 0,01812$ y $LIN_{OL}(\%)=98,1880$

La curva de calibración obtenida en función de la concentración viene dada por la ecuación:

$$A_{650} = 0,08208 + 0,003904 \cdot [APG - R_{12-14}DP_{1.5}] \quad [6.8]$$

Sensibilidad

Según las ecuaciones [6.3] y [6.4] se obtiene que: un incremento de la concentración de 1 mg/L supone un aumento de la señal analítica de 0,003904 unidades y que el método distingue cambios de concentración de 4,2059 mg/L.

Precisión

En la tabla 6.4 se muestran los valores de S_c para cada valor de concentración, obtenidos según la ecuación [6.5]:

Tabla 6.4. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 100 mg/L para el APG- $R_{12-14}DP_{1.5}$

Concentración mg/L	S_c	S_c/c
0	0,17556	--
5	0,31695	0,06339
10	0,31697	0,03170
20	0,23254	0,01163
30	0,31704	0,01057
40	0,19661	0,00492

Tabla 6.4. (Continuación) Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 100 mg/L para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Concentración mg/L	S _c	S _{d/c}
0,17591	0,00352	0,17591
0,23276	0,00388	0,23276
0,31720	0,00453	0,31720
0,19686	0,00246	0,19686
0,31728	0,00353	0,31728
0,16256	0,00163	0,16256

n = 12, \bar{c} = 50 mg/L

Limites inferiores

Límite de detección (DL)

El valor obtenido para el límite de detección según la ecuación [6.6] es de 0,5267 mg/L.

Límite de cuantificación (QL)

El valor obtenido para el límite de cuantificación según la ecuación [6.7] es de 1,7556 mg/L.

Los parámetros de calidad obtenidos en el método de la antrona para el análisis de APG's demuestran que este procedimiento es adecuado para el análisis del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

6.1.3. Método de análisis del Yodo-Yoduro para tensioactivos no iónicos

La recta de calibración se realizó, según el método descrito en el apartado 4.3.1.4., como puede verse en la figura 6.7:

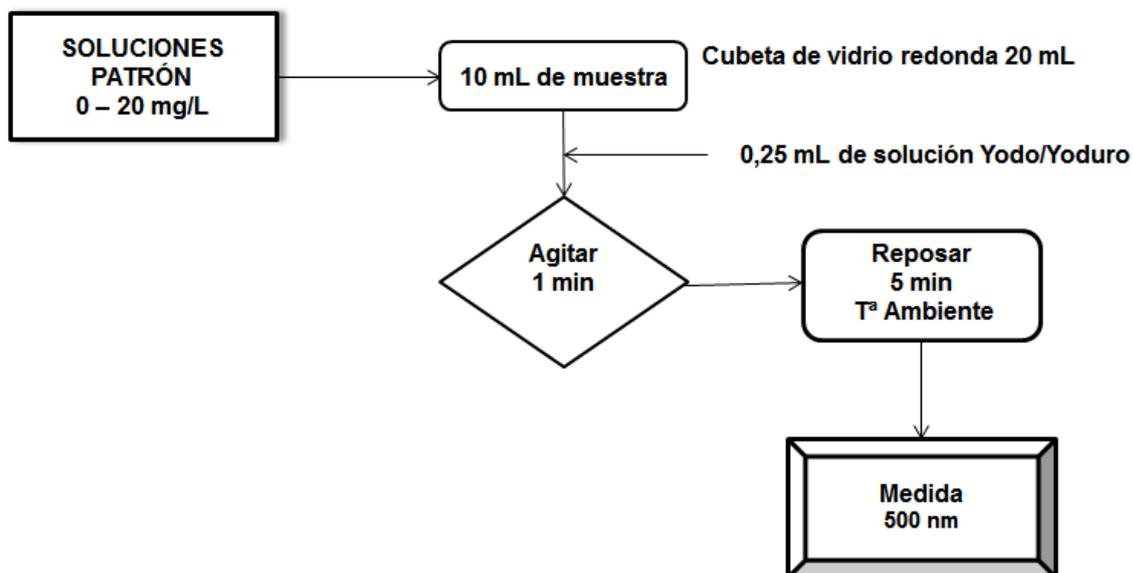


Figura 6.7. Procedimiento analítico para la determinación de tensioactivos no iónicos por el método del yodo/yoduro.

Los parámetros de calidad del método analítico propuesto se han calculado a partir de rectas de calibrado obtenidas en el rango de concentración de tensioactivo comprendido entre 0 y 20 mg/L. En la figura 6.8 se muestran, a título de ejemplo, los valores de absorbancia medidos a 500 nm frente a un blanco con aire a distintas concentraciones de tensioactivo.

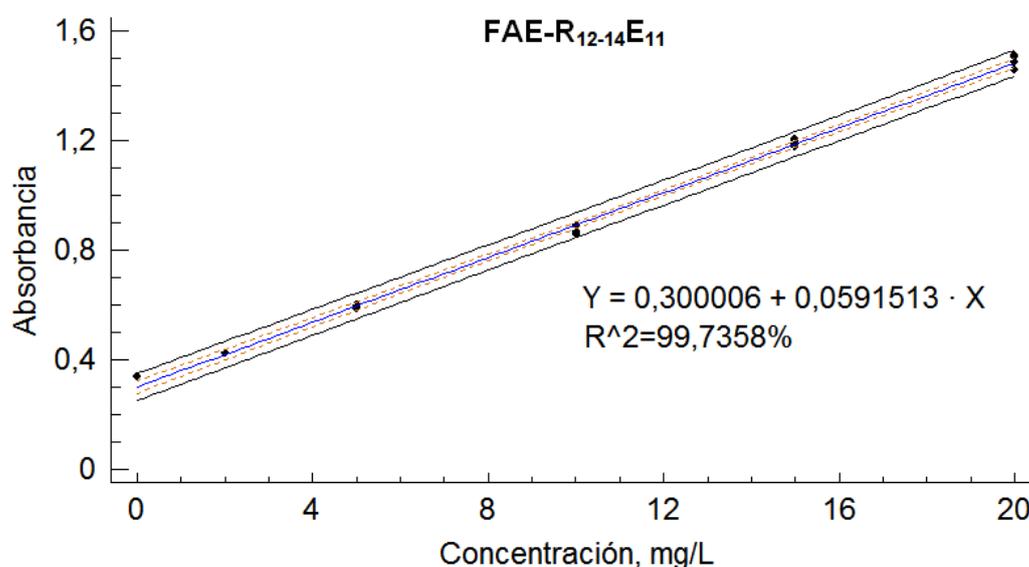


Figura 6.8. Recta de calibrado obtenida para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizando el método del yodo/yoduro

Para las rectas de calibración (Figura 6.8) se ensaya un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Los parámetros del análisis de regresión se muestran en la tabla 6.5:

Tabla 6.5. Parámetros del análisis de regresión para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

a	0,3000
b	0,05915
S _a	0,01041
S _b	0,0007861
S _r	0,02074
r	0,9987
R ²	99,7358%

El valor-P de la ANOVA es menor que 0,05 (P=0,0000), por lo que hay una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado, explica el 99,7358% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,9987, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar para los residuos es de 0,02074.

Linealidad y homocedasticidad

El valor-P para la falta de ajuste es mayor o igual que 0,05 (P_{LOF}=0,0562), el modelo parece ser adecuado para los datos observados no habiendo una diferencia estadísticamente significativa.

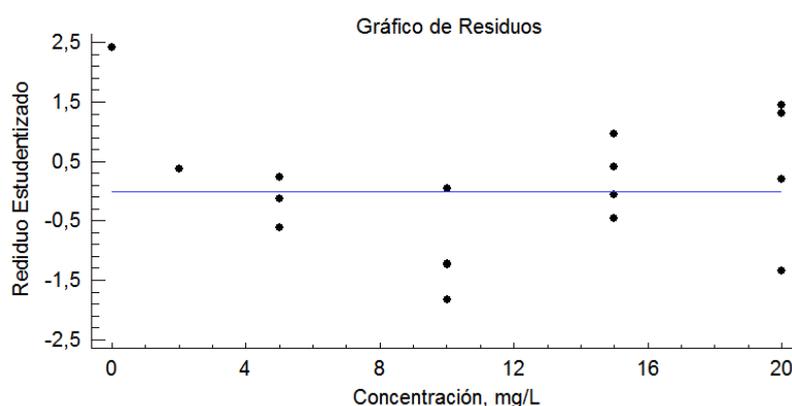


Figura 6.9. Grafico de residuales la recta de calibración del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

El error absoluto medio (MAE) es de 0,01563 siendo el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan los datos. Puesto que el valor-P ($P_{DW} = 0,0538$) es mayor que 0,05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Los valores de la linealidad “on-line”, según la ecuación [6.1], obtenidos son: $R^2 = 99,7358\%$; $(S_b/b) = 0,01329$ y $LIN_{OL}(\%) = 98,6710\%$

La curva de calibración obtenida en función de la concentración viene dada por la ecuación:

$$A_{650} = 0,3000 + 0,05915 \cdot [FAE - R_{12-14}E_{11}] \quad [6.9]$$

Sensibilidad

Según las ecuaciones [6.3] y [6.4] se obtiene que: un incremento de la concentración de 1 mg/L supone un aumento de la señal analítica de 0,05915 unidades y que el método distingue cambios de concentración de 0,3506 mg/L.

Precisión

En la tabla 6.6 se muestran los valores de S_c para cada valor de concentración, obtenidos según la ecuación [6.5]:

Tabla 6.6. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 20 mg/L para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Concentración mg/L	S_c	S_c/c
0	0,39008	--
2	0,39057	0,19528
5	0,25510	0,05102
10	0,23457	0,02346
15	0,23658	0,01577
20	0,23858	0,01193

$n = 6, \bar{c} = 10 \text{ mg/L}$

Limites inferioresLímite de detección (DL)

El valor obtenido para el límite de detección según la ecuación [6.6] es de 1,1704 mg/L.

Límite de cuantificación (QL)

El valor obtenido para el límite de cuantificación según la ecuación [6.7] es de 3,9008 mg/L.

Los parámetros de calidad obtenidos en el método del yodo/yoduro para el análisis de tensioactivos no iónicos demuestran que este procedimiento es adecuado para el análisis del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

6.1.4 Método simplificado de análisis para la determinación del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ como tensioactivo aniónico (MBAS).

La recta de calibración se realizó, según el método descrito en el apartado 4.3.1.4., como puede verse en la figura 6.10:

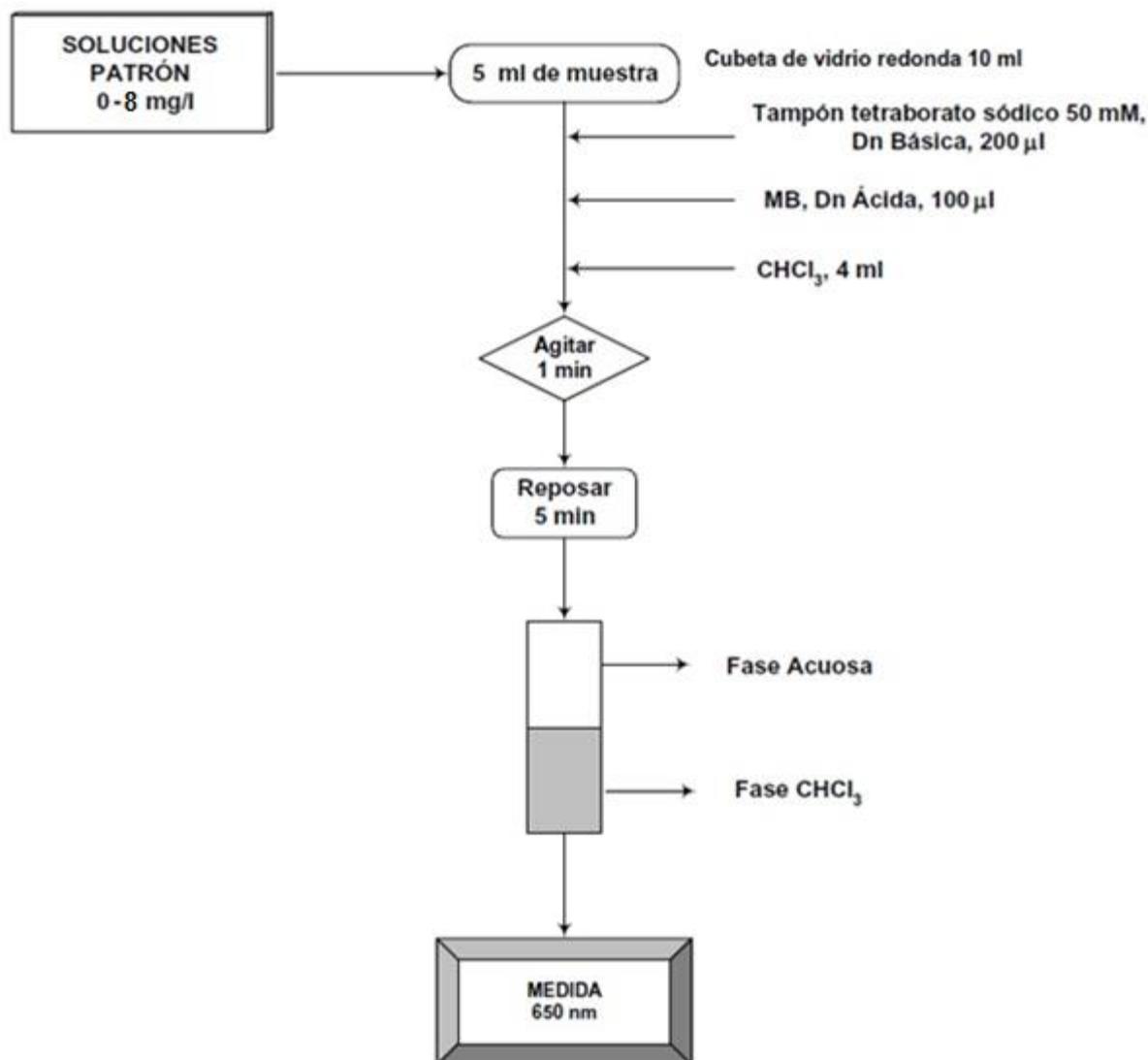


Figura 6.10. Procedimiento analítico para la determinación del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ por el método del MBAS.

Los parámetros de calidad del método analítico propuesto se han calculado a partir de rectas de calibrado obtenidas en el rango de concentración de tensioactivo comprendido entre 0 y 20 mg/L. En la figura 6.10 se muestran, a título de ejemplo, los valores de absorbancia medidos a 650 nm frente a un blanco con aire a distintas concentraciones de tensioactivo.

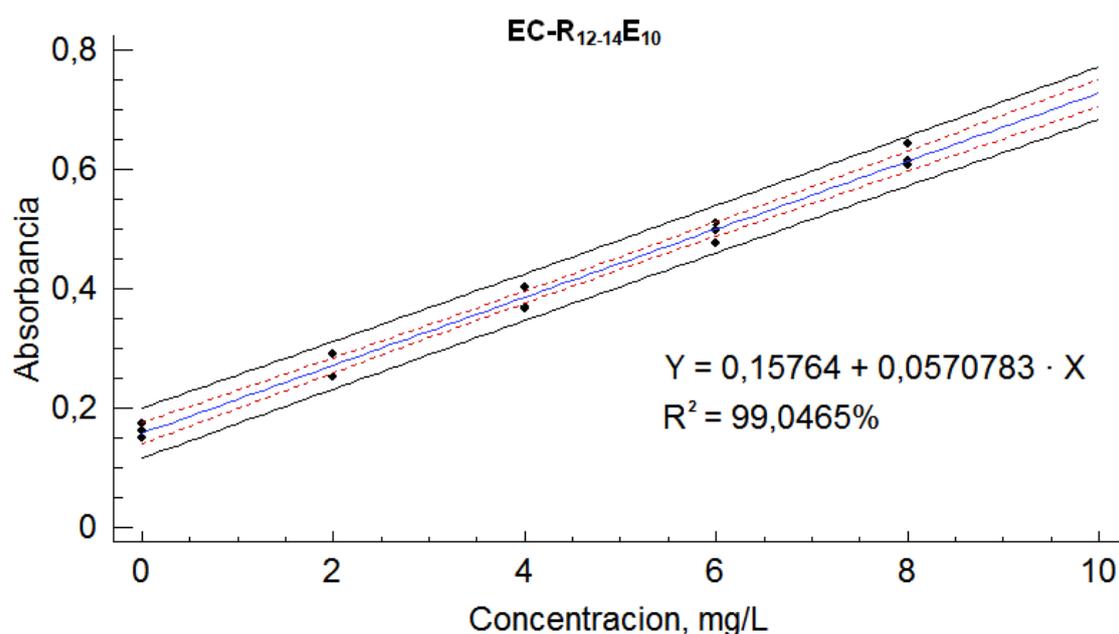


Figura 6.11. Recta de calibrado obtenida para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizando el método del MBAS

Para las rectas de calibración (Figura 6.11) se ensaya un ajuste lineal por mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Los parámetros del análisis de regresión se muestran en la tabla 6.7:

Tabla 6.7. Parámetros del análisis de regresión para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

a	0,15764
b	0,05708
S _a	0,008152
S _b	0,001617
S _r	0,01739
r	0,99522
R ²	99,0465%

El valor-P de la ANOVA es menor que 0,05 (P=0,0000), por lo que hay una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y Concentración con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado, explica el 99,0465% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,99522, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar para los residuos es de 0,01739.

Linealidad y homocedasticidad

El valor-P para la falta de ajuste es mayor o igual que 0,05 ($P_{LOF} = 0,7057$), el modelo parece ser adecuado para los datos observados no habiendo una diferencia estadísticamente significativa.

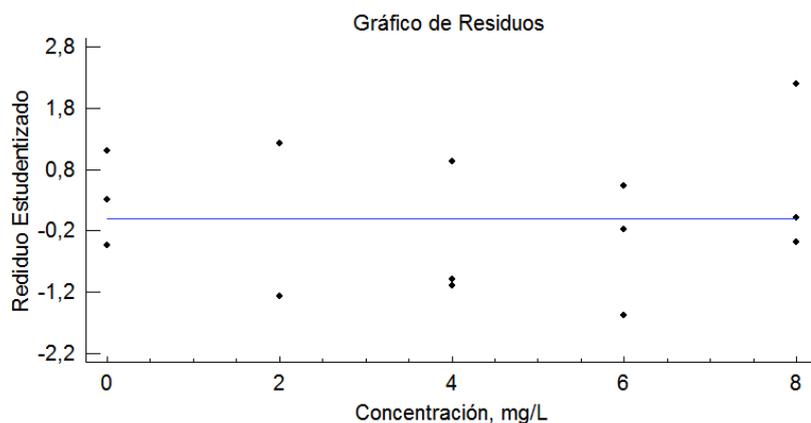


Figura 6.12. Grafico de residuales la recta de calibración del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

El error absoluto medio (MAE) de 0,0137183 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada e el orden en que se presentaron en su archivo de datos. Dado que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0%.

Los valores de la linealidad “on-line”, según la ecuación [6.1], obtenidos son: $R^2 = 99,0465\%$; $(S_b/b) = 0,028329$ y $LIN_{OL}(\%) = 97,1671\%$

La curva de calibración obtenida en función de la concentración viene dada por la ecuación:

$$A_{650} = 0,15764 + 0,05708 \cdot [EC - R_{12-14}E_{10}] \quad [6.10]$$

Sensibilidad

Según las ecuaciones [6.3] y [6.4] se obtiene que: un incremento de la concentración de 1 mg/L supone un aumento de la señal analítica de 0,05708 unidades y que el método distingue cambios de concentración de 0,3046 mg/L.

Precisión

En la tabla 6.8 se muestran los valores de S_c para cada valor de concentración, obtenidos según la ecuación [6.5]:

Tabla 6.8. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 8 mg/L para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Concentración mg/L	S_c	S_c/c
0	0,19019	--
2	0,23076	0,11538
4	0,19845	0,04961
6	0,20245	0,03374
8	0,20638	0,02580

$n = 5, \bar{c} = 4 \text{ mg/L}$

Limites inferiores

Límite de detección (DL)

El valor obtenido para el límite de detección según la ecuación [6.6] es de 0,57057 mg/L.

Límite de cuantificación (QL)

El valor obtenido para el límite de cuantificación según la ecuación [6.7] es de 1,9019 mg/L.

Los parámetros de calidad obtenidos en el método del yodo/yoduro para el análisis de tensioactivos no iónicos demuestran que este procedimiento es adecuado para el análisis del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

6.2. Determinación de las CMC para los tensioactivos ensayados

Para la estimación de las CMC de cara a ver la influencia que tiene este parámetro sobre la biodegradación y la toxicidad, antes y después de los ensayos de ozonizado; se utilizaron los procedimientos descritos en los apartados 4.6 y 4.7 obteniéndose los datos recogidos en el apartado 5.2

A continuación se muestran las estimaciones de los valores de CMC para cada uno de los tensioactivos ensayados, utilizado agua destilada igual que la usada en el resto de ensayos; y a 25°C.

6.2.1 APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

En la figura 6.13 puede verse la representación de los valores de tensión superficial obtenidos a distintas concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} en disolución.

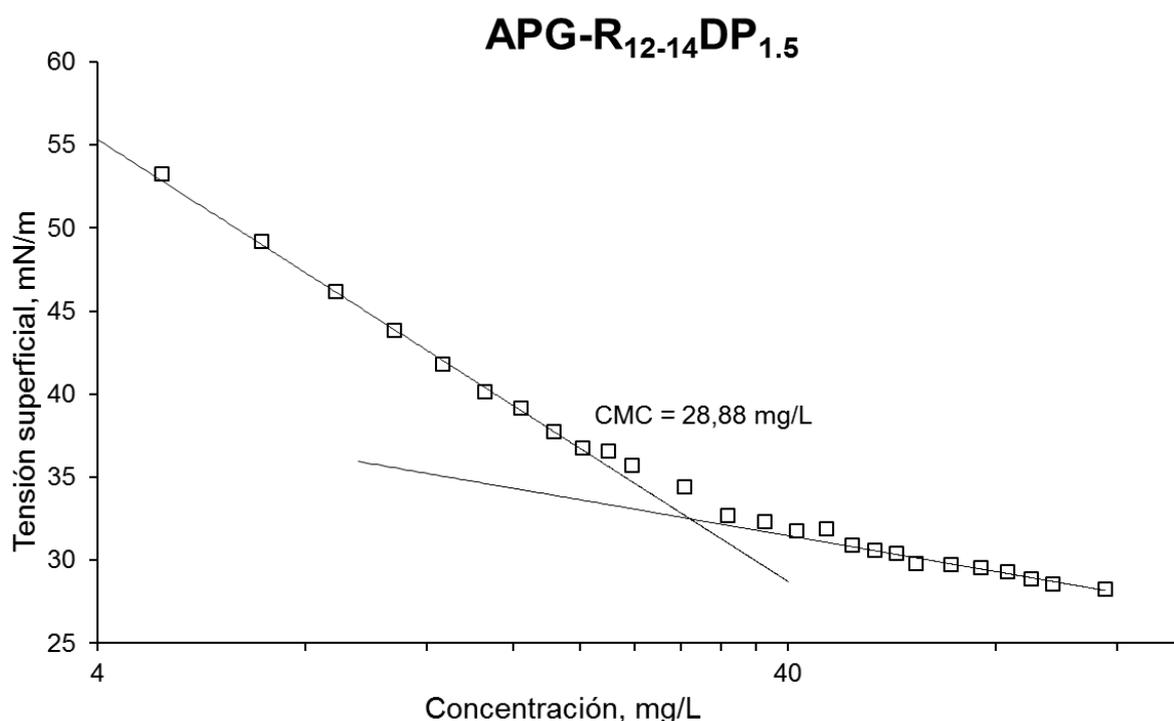
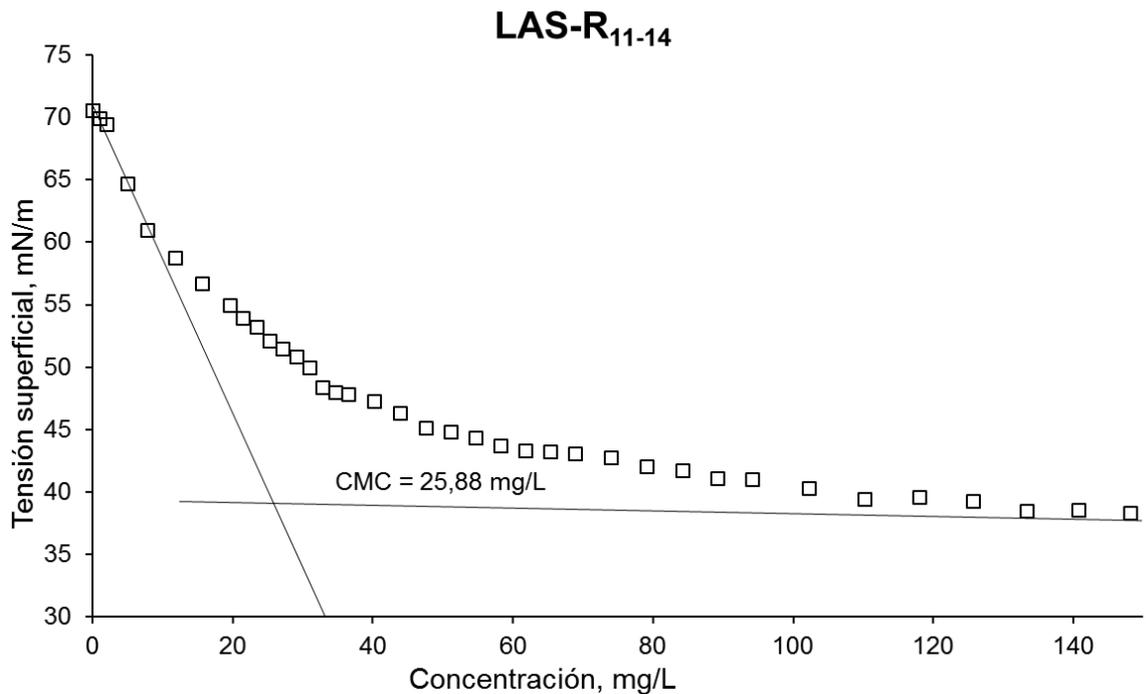


Figura 6.13. Tensión superficial frente a concentración del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} a 25°C y cálculo de la CMC

6.2.2. LAS-R₁₁₋₁₄

En la figura 6.14 puede verse la representación de los valores de tensión superficial obtenidos a distintas concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ en disolución.



43

Figura 6.14. Tensión superficial frente a concentración del LAS-R₁₁₋₁₄ a 25°C y cálculo de la CMC.

Puesto que no hubo un valor pronunciado en el cambio de pendientes (figura 6.14), siendo más bien una transición suave se optó también por la determinación de la CMC por métodos conductimétricos (figura 6.15).

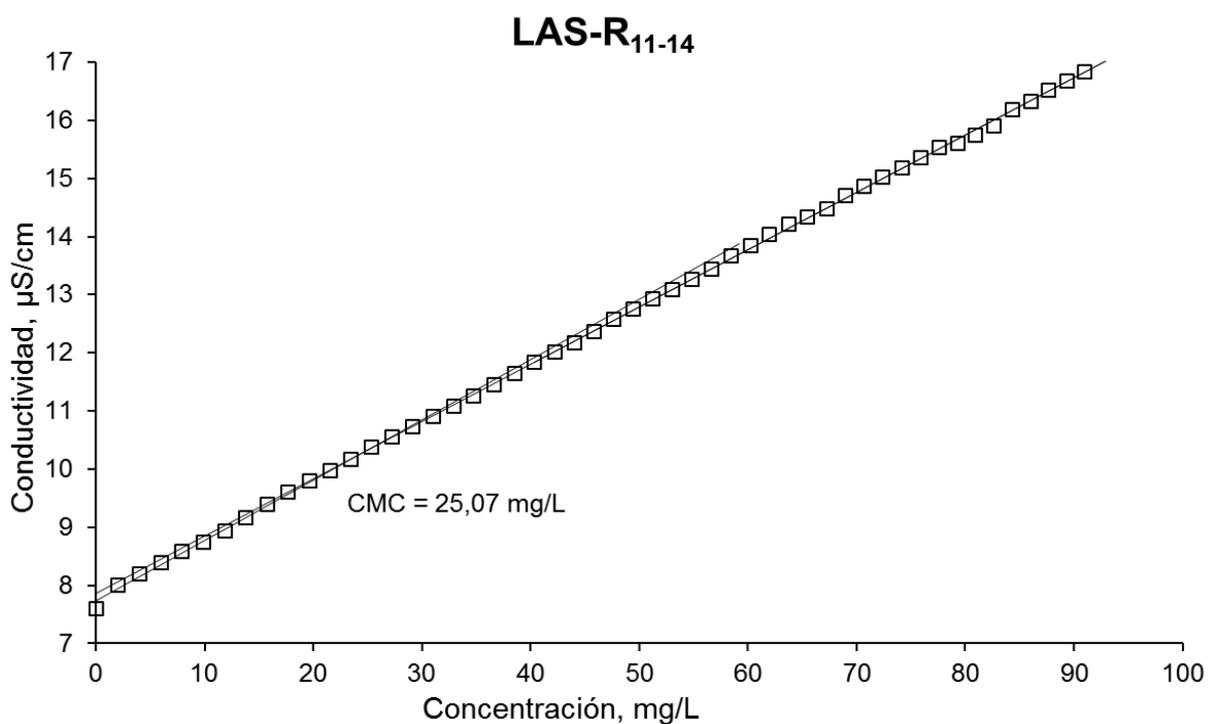


Figura 6.15. Conductividad frente a concentración del LAS-R₁₁₋₁₄ a 25°C y cálculo de la CMC.

El valor medio estimado para la CMC del LAS-R₁₁₋₁₄ a 25°C es de 25,47 mg/L.

6.2.3. FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

En la figura 6.16 puede verse la representación de los valores de tensión superficial obtenidos a distintas concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ en disolución.

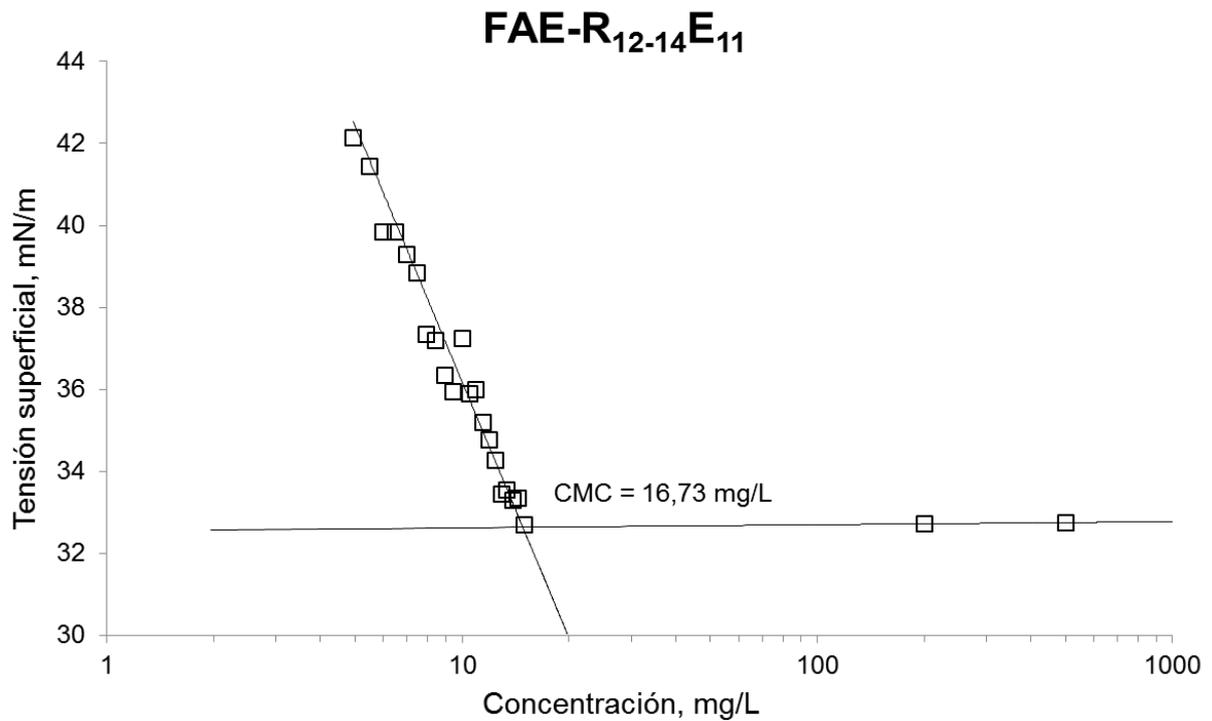


Figura 6.16. Tensión superficial frente a concentración del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ a 25°C y cálculo de la CMC.

6.2.6. EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

En la figura 6.17 puede verse la representación de los valores de tensión superficial obtenidos a distintas concentraciones de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ en disolución.

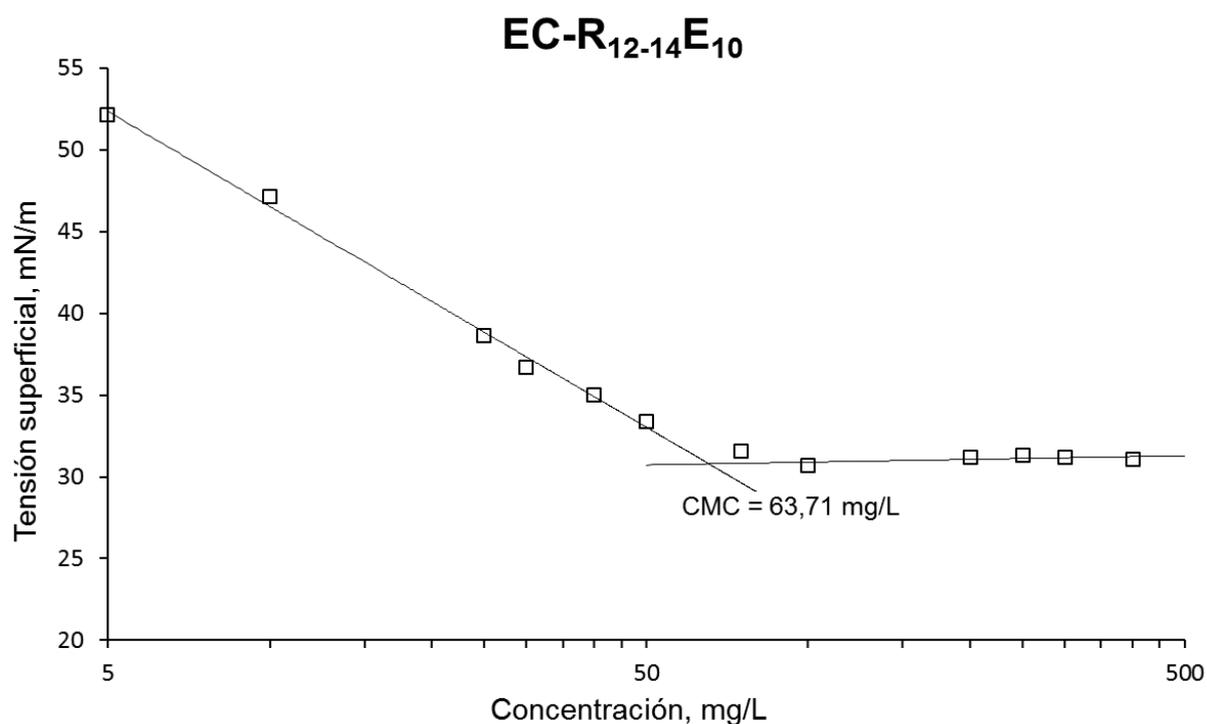


Figura 6.17 Tensión superficial frente a concentración del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ a 25°C y cálculo de la CMC.

6.2.5. Conclusiones

De las figuras anteriores se desprende la tabla 6.9 en la que se muestra a modo de resumen los valores de CMC de las disoluciones de tensioactivos ensayados a 25°C, con agua destilada.

Tabla 6.9. CMC's de los tensioactivos ensayados

Tensioactivo	CMC, mg/L
APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	28,88
LAS-R ₁₁₋₁₄	25,47
FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	16,73
EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	63,71

6.3. Influencia de la ozonización sobre los tensioactivos ensayados

A continuación se muestran las gráficas de la evolución de:

- La concentración residual de tensioactivo
- El carbono orgánico disuelto residual
- La tensión superficial

en función del tiempo de ozonización para los distintos tensioactivos ensayados según el procedimiento descrito en el apartado 4.2

Puesto que el equipo analizador de ozono, interrumpe el flujo de ozono para recalibrarse de manera aleatoria, se midieron los valores de concentración (113 g/Nm^3) y para llevar a cabo las ozonizaciones se utilizó una corriente de by-pass al analizador, evitando así la interrupción de la ozonización.

6.3.1 APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Este tensioactivo en particular presentó numerosos problemas a la hora de ser ozonizado en el reactor de 200 mL descrito en el apartado 4.2.2.2. Al activar la corriente gaseosa de ozono se formaba una cantidad excesivamente alta de espuma, llegando incluso a ser arrastrada hacia las trampas de KI.

Por otro lado el análisis de tensioactivo residual, según el procedimiento descrito en el apartado 4.3.1.3., mostró que al formarse la espuma la concentración en el seno de la disolución disminuía bastante como puede verse en la figura 6.18 induciendo un error a la hora de determinar la verdadera degradación de tensioactivo por el ozono.

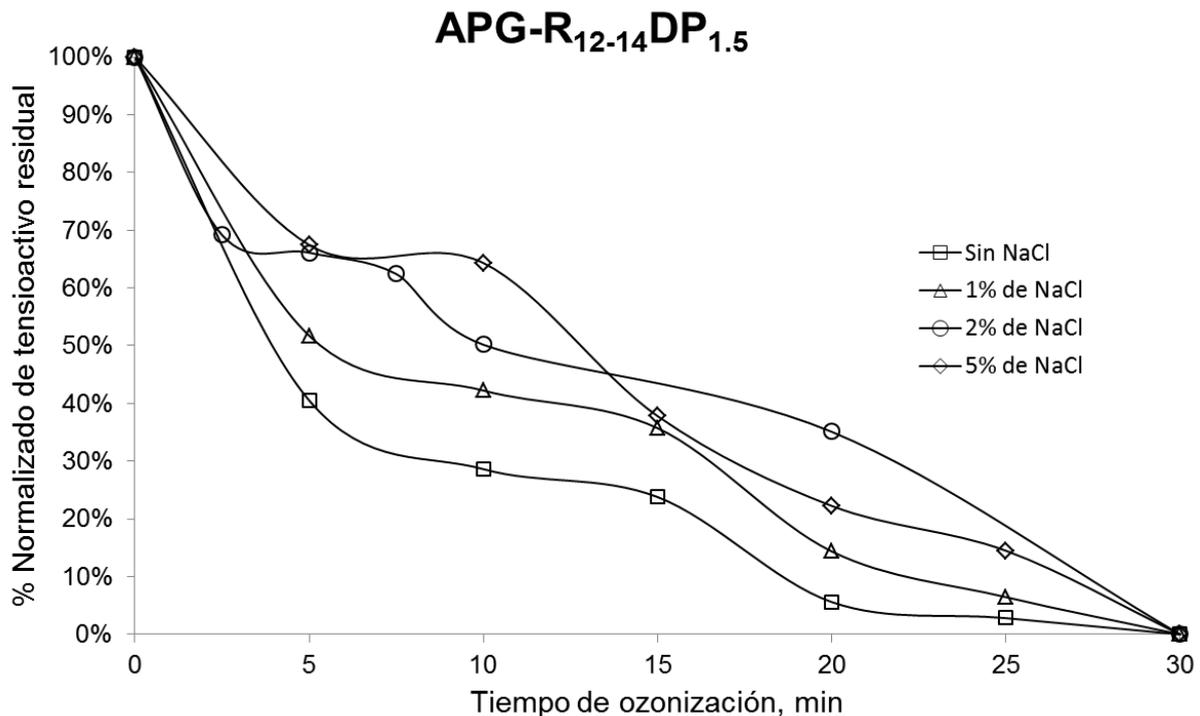


Figura 6.18. Porcentaje de tensioactivo residual normalizado, ozonizado a 5Ln/h, 25°C y distintos porcentajes de NaCl.

Para reducir la cantidad de espuma que se formaba al ozonizar se hicieron ensayos con distintos porcentajes de NaCl, encontrándose que a partir de un 2% de NaCl se evitaba la excesiva formación de espuma (figura 6.18).

Esto, unido a que una concentración de sal del 2% es la usada en los ensayos de toxicidad LUMIStox (apartado 4.4.1.), motivó que los ensayos de ozonización para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} se hicieran con un 2% de NaCl.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la ozonización de una concentración inicial 80 mg/L de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} usando un 2% de NaCl y ozono con un caudal de 5Ln/h y a una temperatura de 25°C.

Se toma una concentración inicial de 80 mg/L ya que concentraciones superiores ensayadas, pese al uso de un 2% de sal, inducían un espumado incontrolable dentro del reactor. Por ello la concentración de 80 mg/L es la elegida para el estudio de la influencia de la ozonización sobre los tensioactivos.

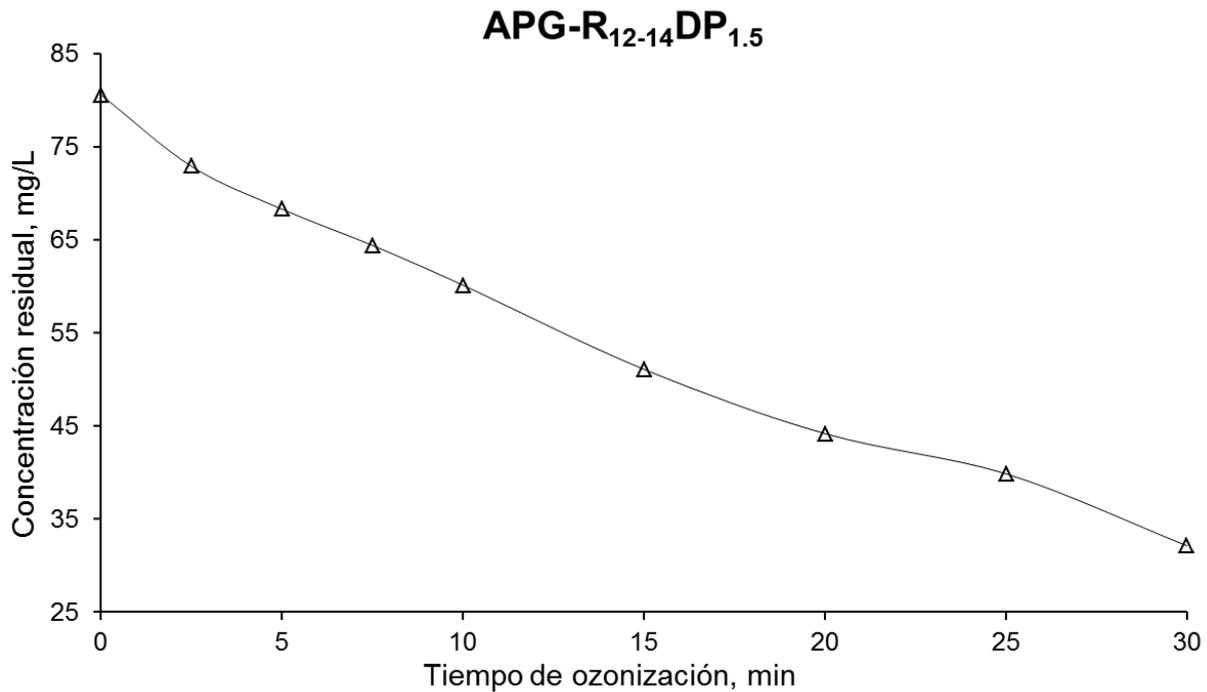


Figura 6.19. Evolución de la concentración de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³, 25°C y con un 2% de NaCl.

Del análisis de la concentración residual de tensioactivo al ser ozonizado se encontró que disminuía progresivamente con el tiempo de ozonización observándose que no se alcanza una eliminación completa del tensioactivo en 30 minutos.

Respecto de la variación del contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en la disolución, que puede verse en la figura 6.20 como a tiempos cortos hay un sobredescenso del contenido en COD motivado por la formación inicial de una capa superficial de espuma al comenzar los ensayos de ozonización, donde estará presente ese sobredescenso de la disolución.

Transcurridos los primeros 5 minutos del ensayo de ozonización desaparece casi por completo la espuma superficial lo cual provoca ese aumento ficticio de COD en torno a los 10 minutos, debido principalmente a que el tensioactivo que se desplazó hacia la fase de espuma vuelve a la fase acuosa de reacción.

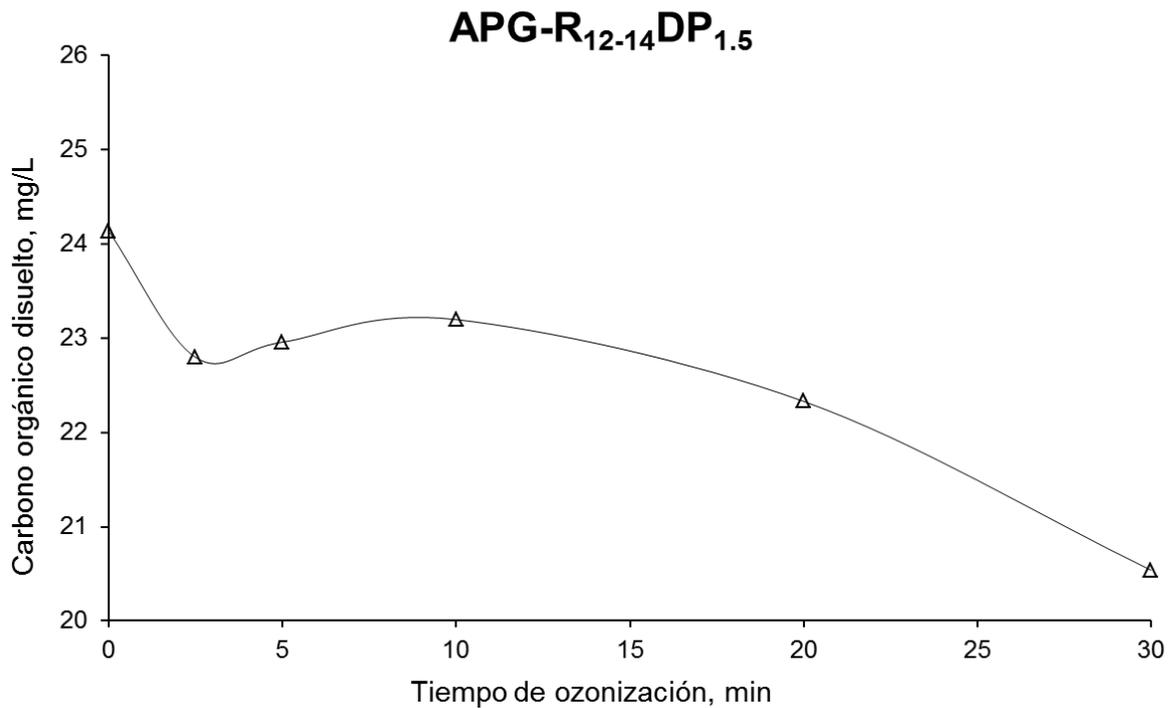


Figura 6.20. Evolución media de la concentración de carbono orgánico disuelto de los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Como puede verse tanto en la figura 6.20 como en la figura 6.21, la disminución del contenido en COD es muy inferior al porcentaje de disminución de la concentración del tensioactivo de partida. Esto corrobora que la mineralización de tensioactivo no es completa. De hecho como se aprecia en la figura 6.21 la mineralización alcanzada es baja.

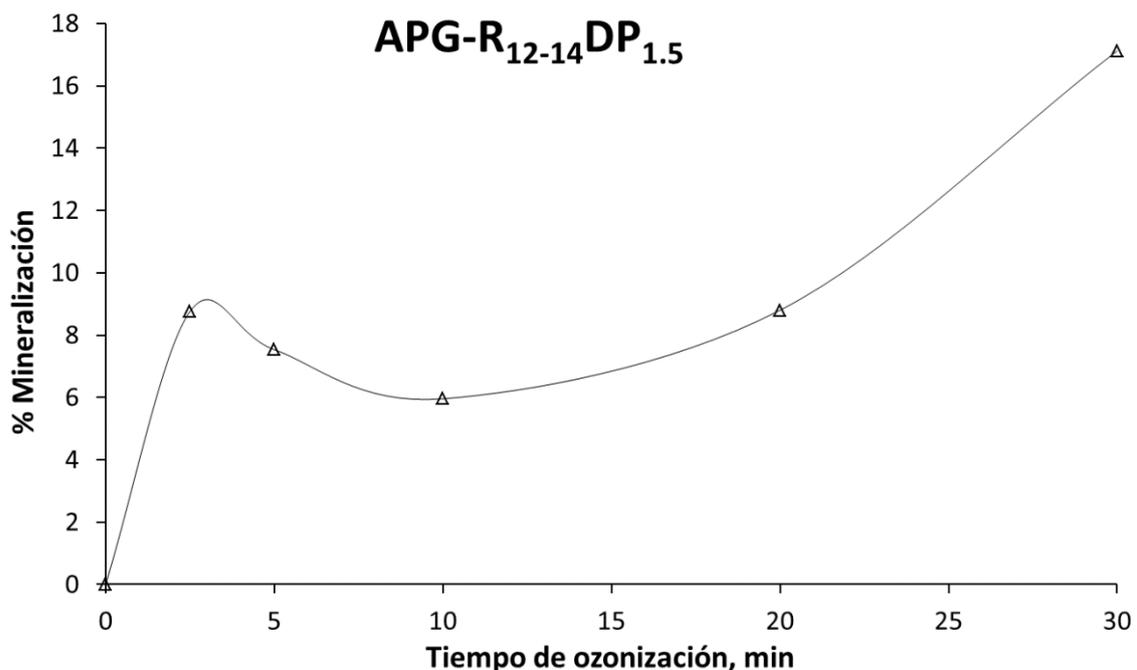


Figura 6.21. Mineralización media de los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Esta tendencia a valores de mineralización alcanzados bajos fueron también encontrado por Ledakowicz, 2005.

Se plantea por tanto que el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, al verse degradado por el ozono y su múltiples reactivos asociados, genera una serie de productos intermedios llegando en ultima instancia a la mineralización completa (CO₂ y H₂O).

Respecto a la tensión superficial y como puede verse en la figura 6.22, la degradación del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} lleva a un aumento de la misma a medida que aumenta el tiempo de exposición al ozono.

Esto indica que los productos intermedios que se producen en la degradación del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, presentan menor actividad superficial teniendo por tanto una mayor tensión superficial.

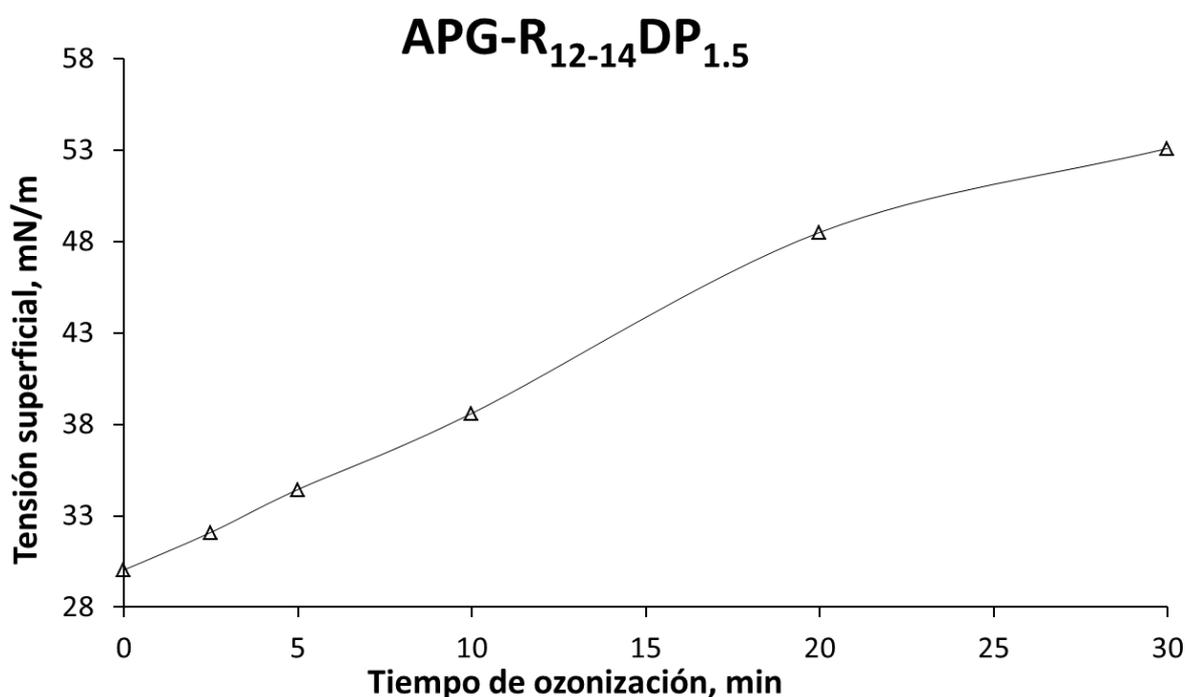


Figura 6.22. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Podemos concluir, que en general se encuentra que existe una tendencia clara a aumentar la tensión superficial a medida que transcurre la ozonización sobre el tensioactivo APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

6.3.2. LAS-R₁₁₋₁₄

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la ozonización de una concentración inicial 80 mg/L (impuesta por los requisitos de ozonización para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}) de LAS-R₁₁₋₁₄ usando ozono con un caudal de 5Ln/h, una concentración de 113g/Nm³ y a una temperatura de 25°C.

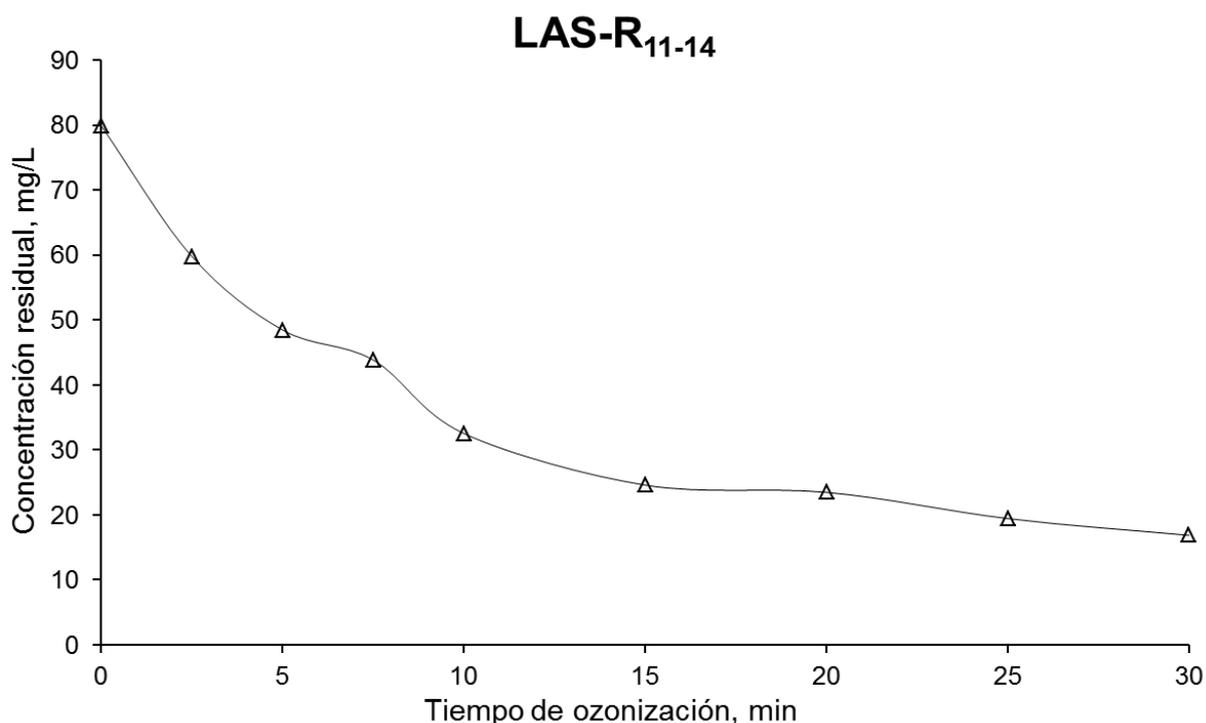


Figura 6.23. Evolución de la concentración de LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Del análisis de la concentración residual de tensioactivo al ser ozonizado se encontró que a mayor tiempo de ozonización la disminución de la concentración de tensioactivo es mayor no llegándose a una degradación completa transcurridos los 30 minutos.

Respecto de la variación del contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en la disolución, que puede verse en la figura 6.24 como a tiempos cortos hay un sobredescenso del contenido en COD motivado por la formación inicial de una capa superficial de espuma al comenzar los ensayos de ozonización, donde estará presente ese sobredescenso de la disolución.

Transcurridos los primeros 10 minutos del ensayo de ozonización desaparece casi por completo la espuma superficial lo cual provoca ese aumento ficticio de COD en torno a los 15 minutos, debido principalmente a que el tensioactivo que se desplazó hacia la fase de espuma vuelve a la fase acuosa de reacción.

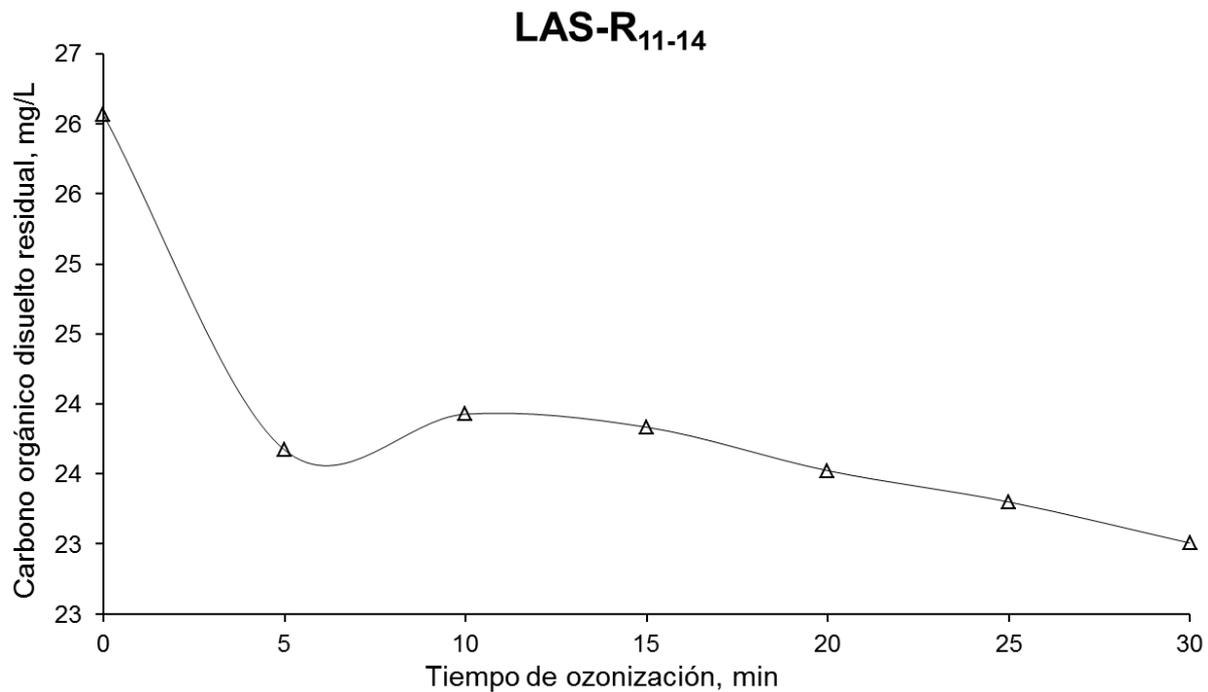


Figura 6.24. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Como puede verse tanto en la figura 6.24 como en la figura 6.25, la disminución del contenido en COD es muy inferior al porcentaje de disminución de la concentración del tensioactivo de partida. Esto corrobora que la mineralización de tensioactivo no es completa. De hecho como se aprecia en la figura 6.25, la mineralización de la disolución alcanzada es baja.

Nuevamente, esta tendencia a valores de mineralización alcanzados bajos, se corresponde también con los reportados por Ledakowicz, 2005.

Se plantea por tanto que el LAS-R₁₁₋₁₄, al verse degradado por el ozono y su múltiples reactivos asociados, genera, al igual que el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, una serie de productos intermedios llegando en última instancia a la mineralización completa (CO₂ y H₂O).

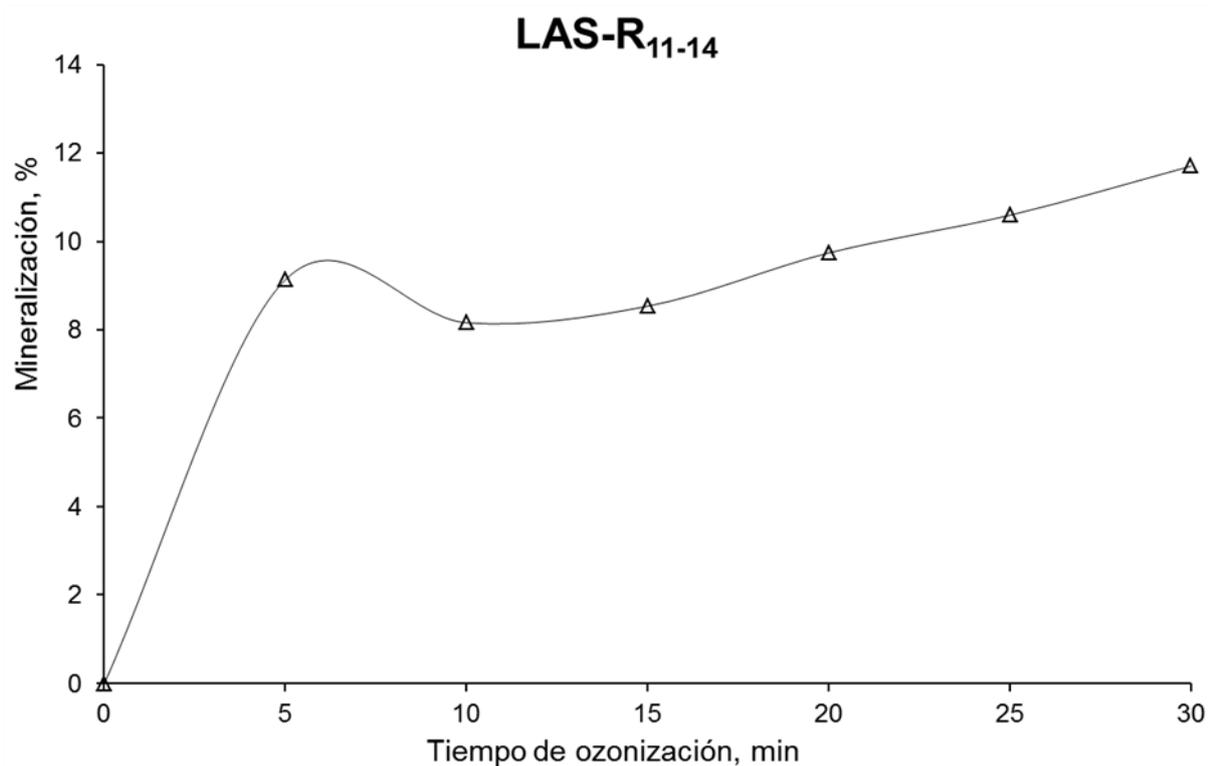


Figura 6.25 Mineralización en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Respecto a la tensión superficial y como puede verse en la figura 6.26, la degradación del LAS-R₁₁₋₁₄ lleva a unas variaciones de tensión superficial que presentan máximos y mínimos relativos también encontrados por Jurado, 2011; conduciendo, a altos tiempos de ozonización, hacia un incremento de la tensión superficial respecto de la inicial.

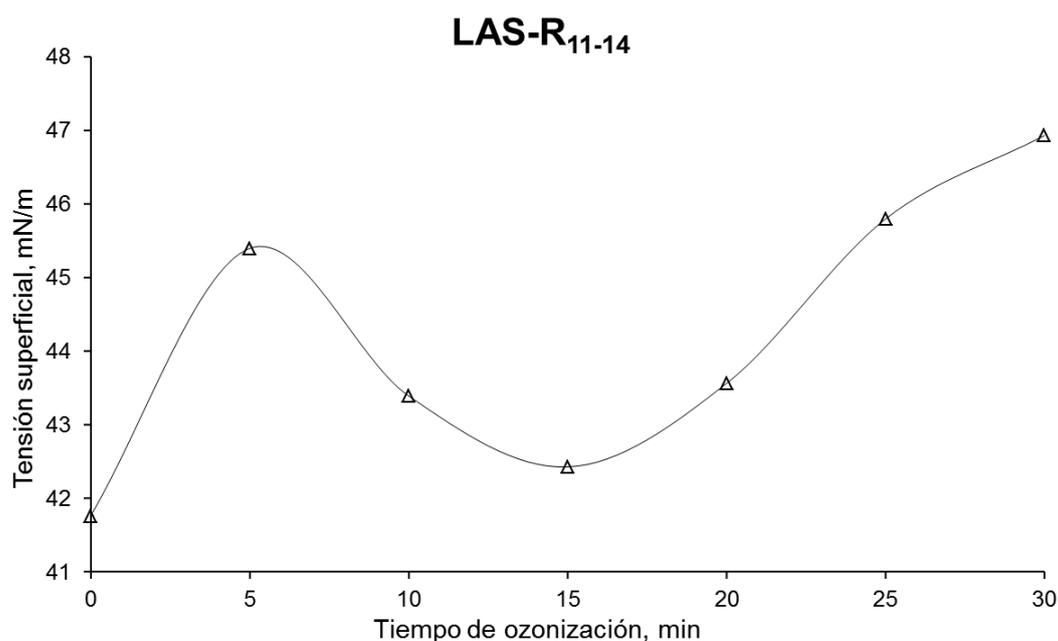


Figura 6.26. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Inicialmente en torno a los 5 minutos, hay un incremento de la tensión superficial, probablemente debido en parte a la movilización del tensioactivo hacia la capa de espuma inicial que se forma y a la rotura inicial del tensioactivo que conlleva a productos con menos actividad superficial.

Sin embargo, la capa de espuma inicial formada, no persiste tanto tiempo ($t < 5 \text{ min}$) como para justificar valores superiores de tensión superficial en torno a los 10 minutos, por lo que dichos valores superiores de tensión superficial se relacionan con productos intermedios de menor actividad superficial.

Los productos intermedios han resultado imposibles de identificar y cuantificar, aconsejándose utilizar técnicas cromatográficas para su identificación en investigaciones posteriores.

La existencia de dichos mínimos relativos en la evolución de la tensión superficial puede explicarse por la aparición de productos intermedios con mayor actividad superficial, teniendo el oxígeno presente en el medio una gran influencia sobre su aparición.

Pasados los 20 minutos de ozonización se aprecia como la evolución de la tensión superficial vuelve a corresponderse con la que podría esperarse teóricamente, presentando un incremento de la tensión superficial cuanto menor es la cantidad de oxígeno presente en el medio.

6.3.3. FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la ozonización de una concentración inicial 80 mg/L de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁, cantidad impuesta por los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, usando ozono con un caudal de 5Ln/h, una concentración de 113 g/Nm³ y a una temperatura de 25°C.

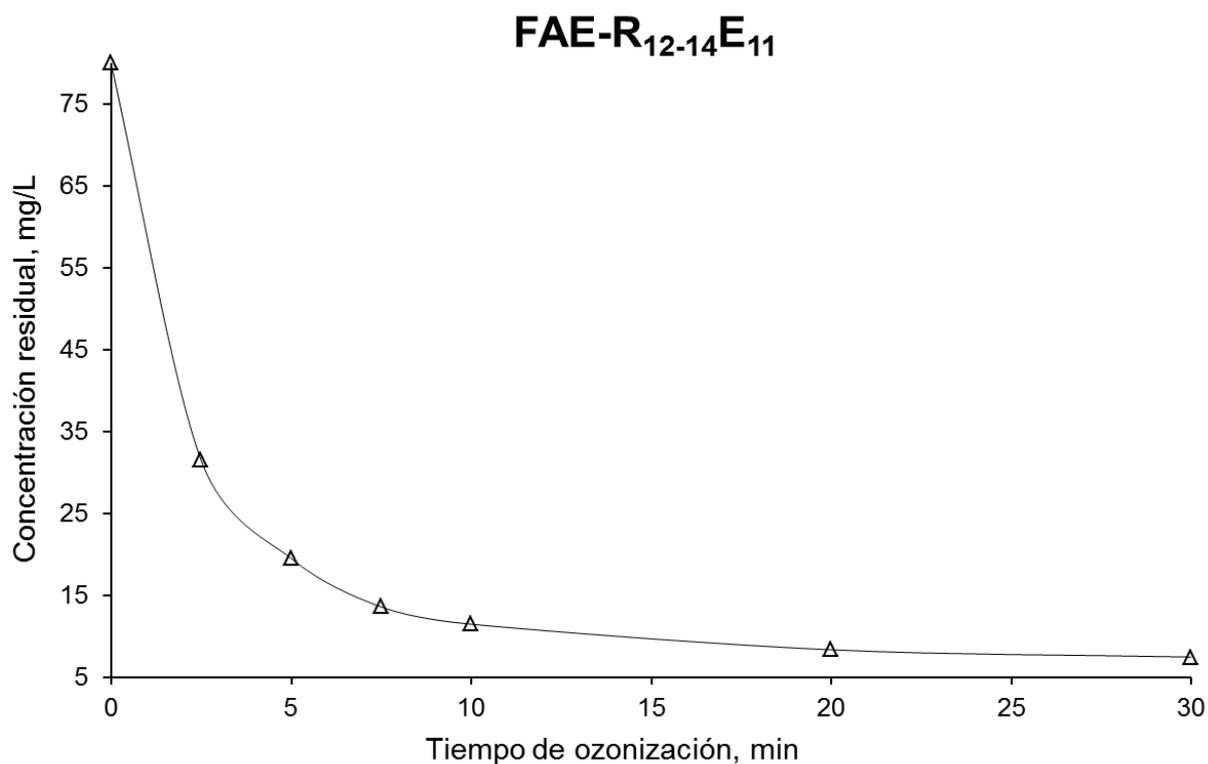


Figura 6.27. Evolución de la concentración de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Del análisis de la concentración residual de tensioactivo al ser ozonizado se encontró que disminuía progresivamente con el tiempo de ozonización observándose que no se alcanza una eliminación completa del tensioactivo en 30 minutos.

Respecto de la variación del contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en la disolución, que puede verse en la figura 6.28 como a tiempos cortos ($t \approx 5$ min) hay nuevamente un sobredescenso del contenido en COD motivado por la formación inicial de una capa superficial de espuma al comenzar los ensayos de ozonización, donde estará presente ese sobredescenso de la disolución.

Transcurridos los primeros 5 minutos del ensayo de ozonización desaparece casi por completo la espuma superficial lo cual provoca ese aumento ficticio de COD en torno a los 10 minutos, debido principalmente a que el tensioactivo que se desplazó hacia la fase de espuma vuelve a la fase acuosa de reacción.

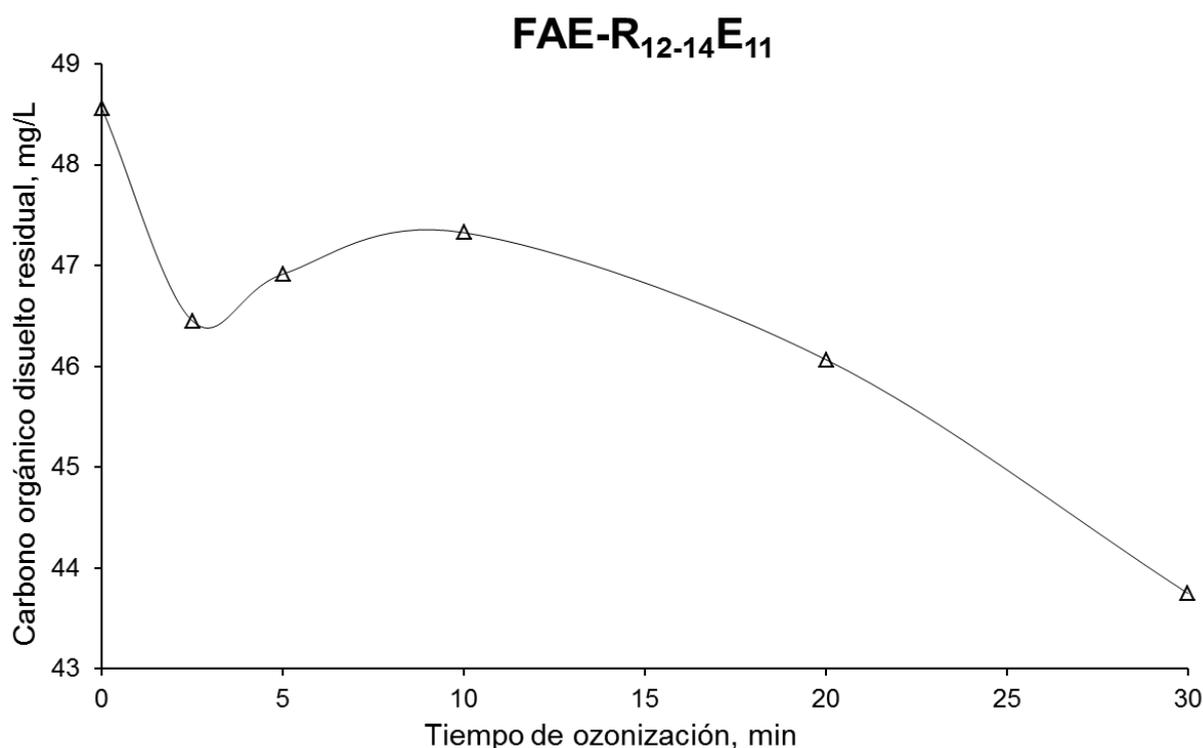


Figura 6.28. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Como puede verse tanto en la figura 6.28 como en la figura 6.29, la disminución del contenido en COD es muy inferior al % de disminución de la concentración del tensioactivo de partida. Esto corrobora que la mineralización de tensioactivo no es completa. De hecho como se aprecia en la figura 6.29 la mineralización de la disolución alcanzada es nuevamente bastante baja.

Se plantea por tanto que el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁, al verse degradado por el ozono y su múltiples reactivos asociados, genera, al igual que los anteriores tensioactivos, una serie de productos intermedios llegándose en última instancia, y aunque en un bajo porcentaje, a la mineralización completa (CO₂ y H₂O).

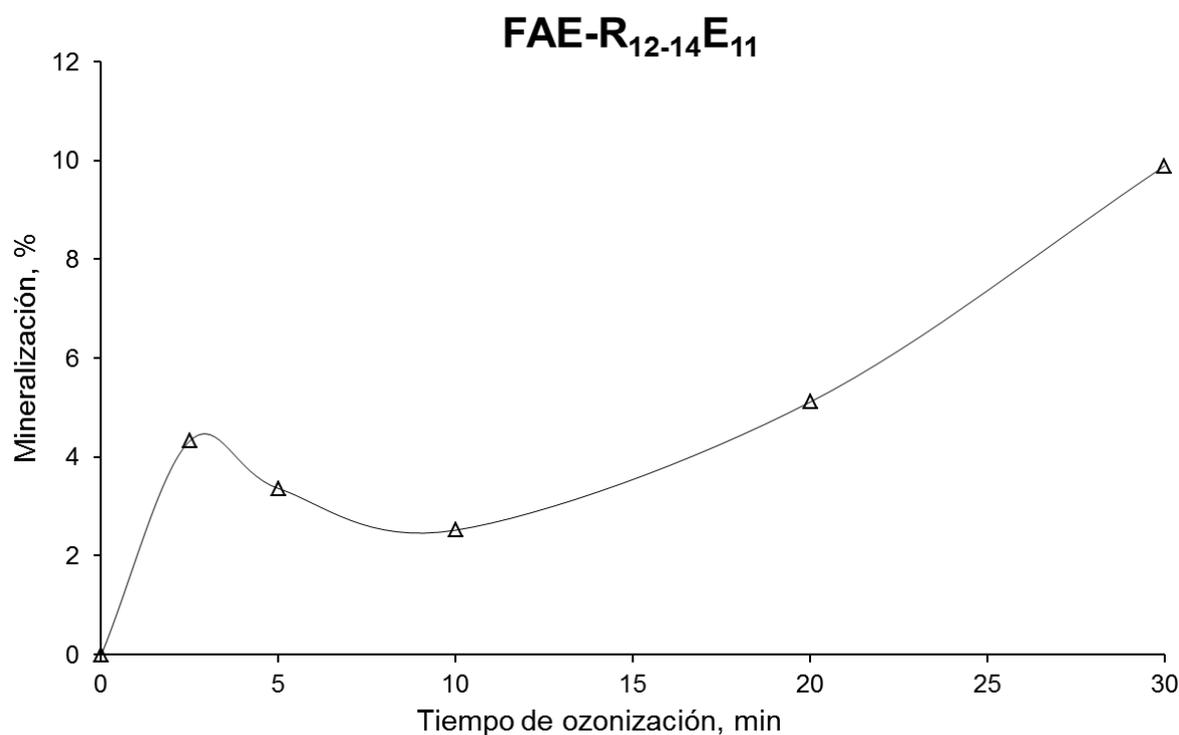


Figura 6.29. Mineralización en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Respecto a la tensión superficial y como puede verse en la figura 6.30, la degradación del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ lleva a una disminución inicial de la tensión superficial, hasta un mínimo alcanzado en torno a los 5 minutos; seguida de un incremento progresivo de la misma.

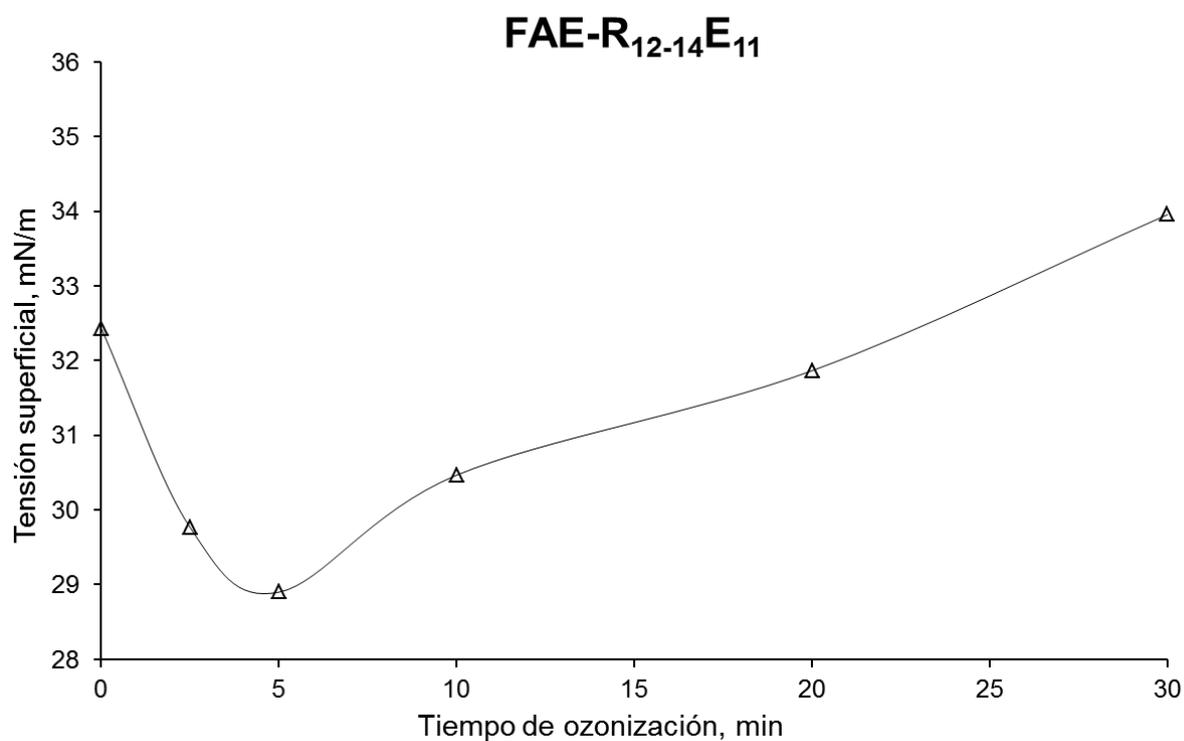


Figura 6.30. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

El descenso observado en la tensión superficial no ha podido ser justificado con los datos experimentales disponibles, aunque lógicamente se relaciona con los productos intermedios de la degradación del tensioactivo con el ozono. La caracterización mediante técnicas cromatográficas, en un siguiente paso de la investigación, ayudaría a la discusión de este fenómeno.

Según lo estudiado por Ledakowicz, 2005; lo más probable es que los grupos éter sufran una degradación hacia diversos compuestos polietoxilados de cadena corta y varios tipos de ácidos de mayor actividad superficial, explicándose por tanto la disminución inicial en la tensión superficial.

6.3.4. EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la ozonización de una concentración inicial 80 mg/L de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀, cantidad impuesta por los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, usando ozono con un caudal de 5Ln/h, una concentración de 113 g/Nm³ y a una temperatura de 25°C.

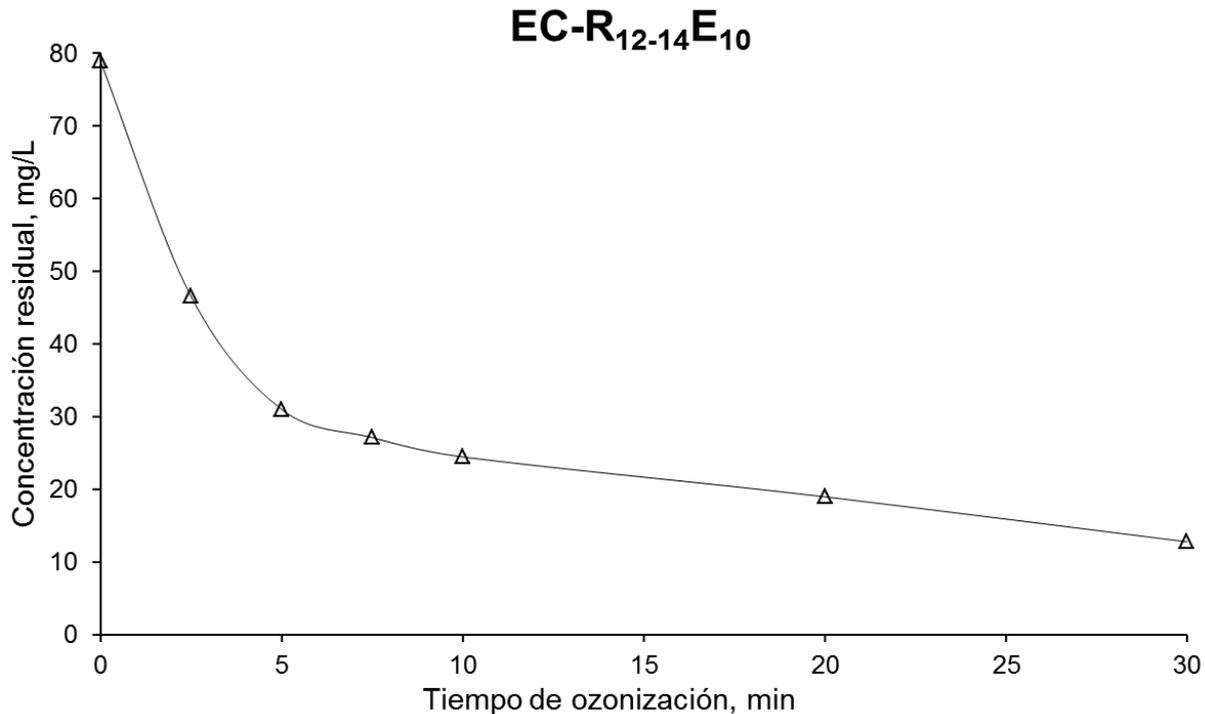


Figura 6.31. Evolución de la concentración de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Del análisis de la concentración residual de tensioactivo al ser ozonizado se encontró que disminuía progresivamente con el tiempo de ozonización observándose que no se alcanza una eliminación completa del tensioactivo en 30 minutos.

Respecto de la variación del contenido de carbono orgánico disuelto (COD) en la disolución, que puede verse en la figura 6.32, se aprecia que a diferencia de los anteriores tensioactivos ensayados, éste no ha presentado un máximo inicial de mineralización. Esto se debe a que la espuma formada durante la ozonización ha sido prácticamente nula.

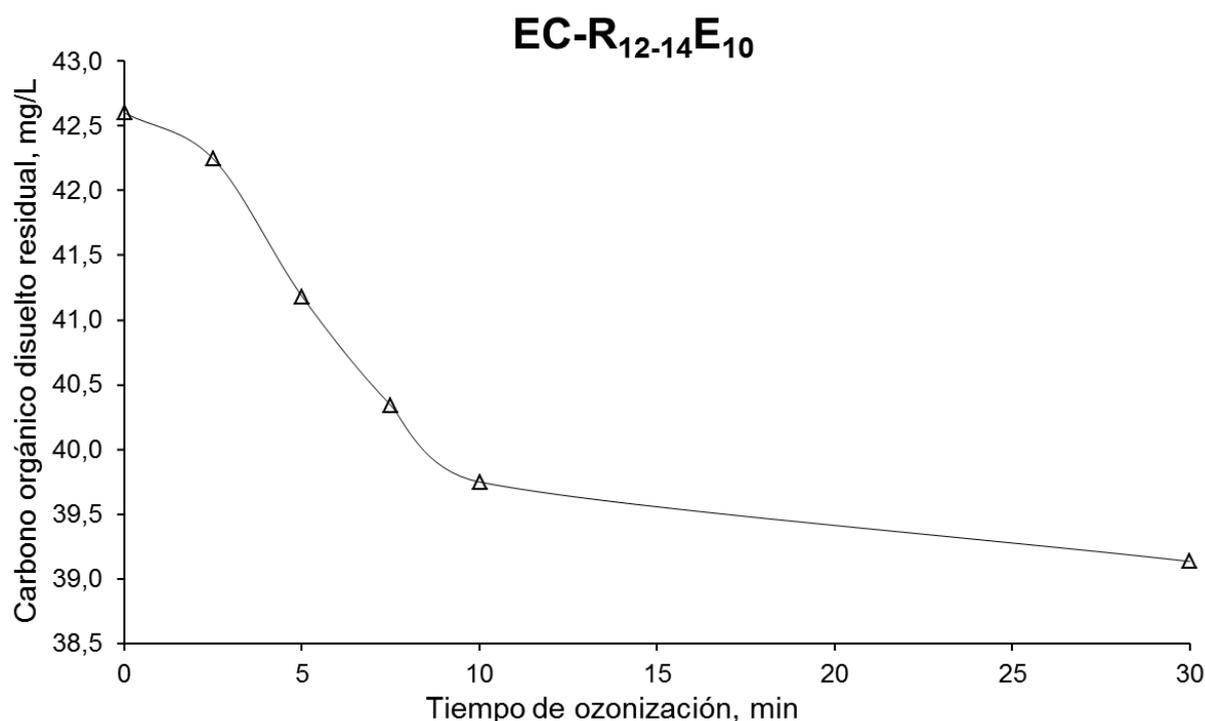


Figura 6.32. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

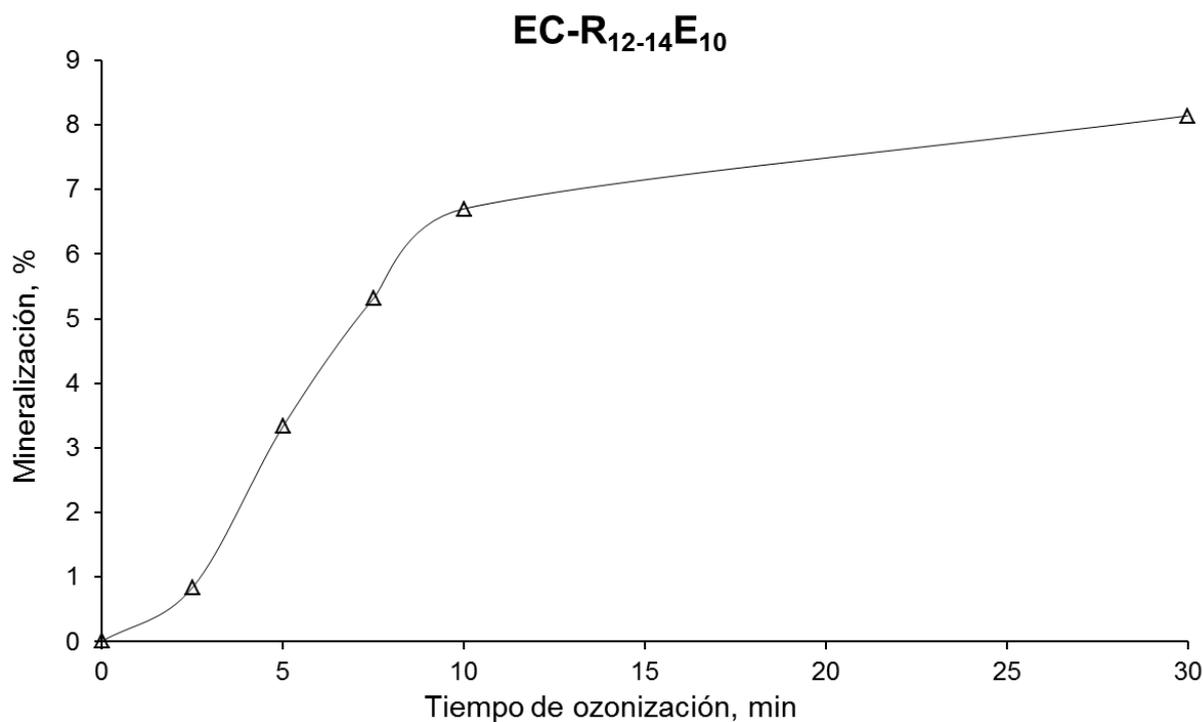


Figura 6.33. Mineralización en los ensayos de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Como se aprecia en las figuras 6.32 y 6.33 la mineralización alcanzada sigue siendo baja lo cual plantea que el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀, al verse degradado por el ozono y sus múltiples reactivos asociados, genera, al igual que los anteriores tensioactivos, una serie de productos

intermedios llegando en última instancia, y aunque en un bajo porcentaje, a la mineralización completa (CO_2 y H_2O).

Respecto a la tensión superficial y como puede verse en la figura 6.30, la degradación del $\text{EC-R}_{12-14}\text{E}_{10}$ lleva a un aumento inicial de la tensión superficial, hasta un máximo alcanzado en torno a los 2,5 minutos; seguida de un descenso hasta un mínimo relativo continuando con un incremento progresivo de la misma.

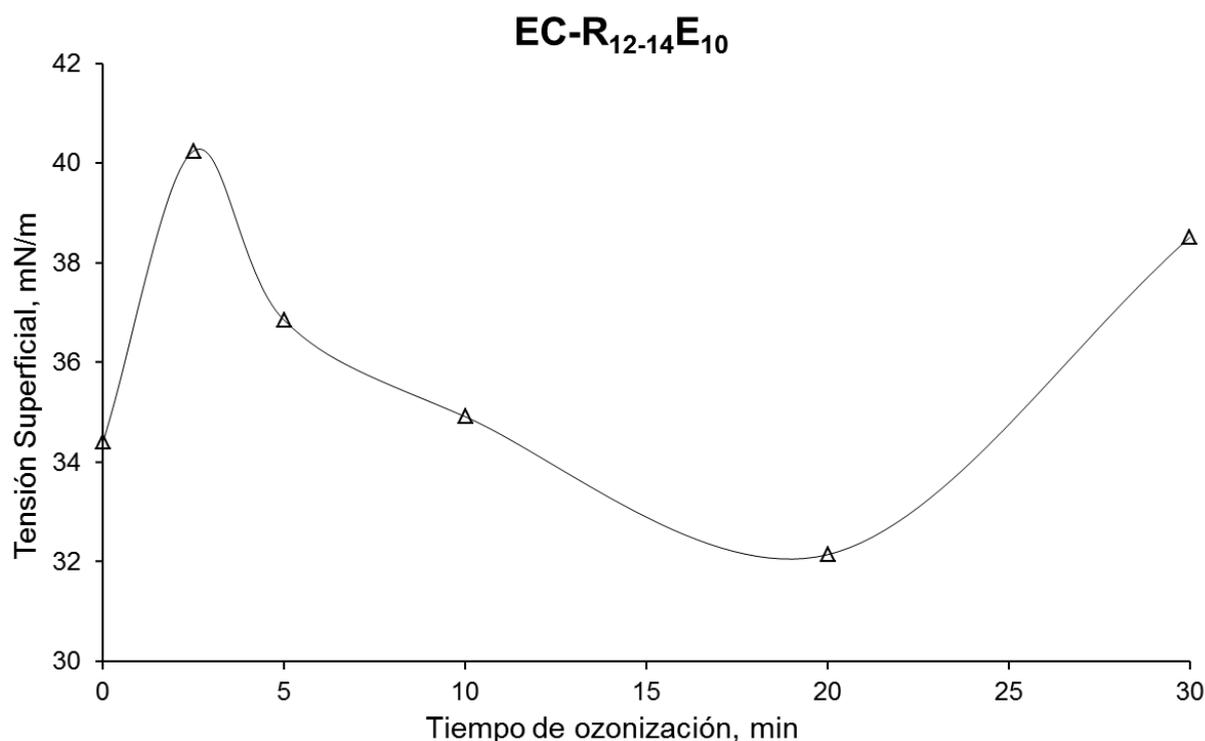


Figura 6.34. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del $\text{EC-R}_{12-14}\text{E}_{10}$

Estas variaciones en la tensión superficial durante la ozonización, y aunque nuevamente resulta imposible de concretar con exactitud, se debe a la existencia de productos intermedios derivados de la ozonización con diferentes actividades superficiales.

El descenso que se produce hasta el mínimo existente a los 20 minutos se relaciona nuevamente con lo estudiado por Ledakowicz, 2005; es decir, lo más probable es que los grupos éter sufran una degradación hacia diversos compuestos polietoxilados de cadena corta y varios tipos de ácidos de mayor actividad superficial, explicándose por tanto la disminución en la tensión superficial.

6.3.5. Cinéticas de degradación

Partiendo de la premisa de que el número de reacciones es elevado y no se conocen todos los reactivos y productos que intervienen en la ozonización, se ha hecho un estudio de la cinética global de degradación del tensioactivo inicial al ozonizar con el objetivo de conocer su orden de reacción y ver si hay diferencias en dicho valor según el tipo de tensioactivo.

La cinética del proceso específico sería del tipo:

$$-\frac{d[T]}{dt} = k_1 \cdot [O_3]^n \cdot [T]^m + k_2 \cdot [OH\cdot]^k \cdot [T]^m + \dots \quad [6.10]$$

Donde:

[T] es la concentración de tensioactivo

[O₃] es la concentración de ozono

[OH·] es la concentración de radicales OH

k_i son constantes cinéticas de la reacción i

t el tiempo

Pero puesto que se desconocen la mayoría de parámetros de las reacciones intermedias existentes en la ozonización, así como el tipo y cantidad de reactivos que atacan al tensioactivo inicial; se ha tomado la siguiente simplificación (partiendo de la hipótesis de que los reactivos permanecen a concentración constante con el tiempo) que representa la cinética de degradación global del tensioactivo inicial:

$$-\frac{d[T]}{dt} = K_G \cdot [T]^n \quad [6.11]$$

Donde K_G es la constante cinética global de degradación que abarca todos los parámetros desconocidos.

Integrando la ecuación 6.11 se obtiene que:

Para n=1

$$\ln\left(\frac{[T]}{[T_0]}\right) = K_G \cdot t \quad [6.12]$$

Para $n \neq 1$

$$\frac{[T]^{1-n}}{n-1} = K_G \cdot t + \frac{[T_0]^{1-n}}{n-1} \quad [6.13]$$

Dadas estas dos expresiones se ajustaron los datos obtenidos para los ensayos de ozonización obteniéndose los datos recogidos en la tabla 6.10

Tabla 6.10. Parámetros cinéticos de la degradación de los tensioactivos ensayados.

Tensioactivo	n	Error n	K _G	Error K _G	R ²
APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	1,01754	0,14362	0,02759	0,01625	0,98627
LAS-R ₁₁₋₁₄	2,43455	0,15407	3,6127E-4	2,0679E-4	0,95792
FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	2,26939	0,14746	0,00291	0,00149	0,99715
EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	2,73011	0,21117	2,0391E-4	1,60513E-4	0,99313

Observando los resultados obtenidos, mostrados en la tabla 6.10, del ajuste a la ecuación 6.13 según los ordenes de reacción obtenidos; se observa que:

- El APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} parece tener un orden de reacción medio de 1
- El LAS-R₁₁₋₁₄ y el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ parecen tener un orden de reacción medio de 2

Bajo estas premisas se realizaron los ajustes, mostrados en la tabla 6.11, fijando dichos ordenes de reacción.

Tabla 6.11. Parámetros cinéticos de la degradación de los tensioactivos ensayados fijando el orden de reacción.

Tensioactivo	n	K _G	Error K _G	R ²
APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}	1	0,02938	7,74995E-4	0,9864
LAS-R ₁₁₋₁₄	2	0,00183	7,62892E-5	0,9863
FAE-R ₁₂₋₁₄ E ₁₁	2	0,00755	4,34767E-4	0,99562
EC-R ₁₂₋₁₄ E ₁₀	2	0,00319	2,87273E-4	0,9756

Del mismo modo se presentan dichos ajustes en las figuras 6.35, 6.36, 6.37 y 6.38, observándose como dichos modelos cinéticos predicen bastante bien el proceso de degradación global

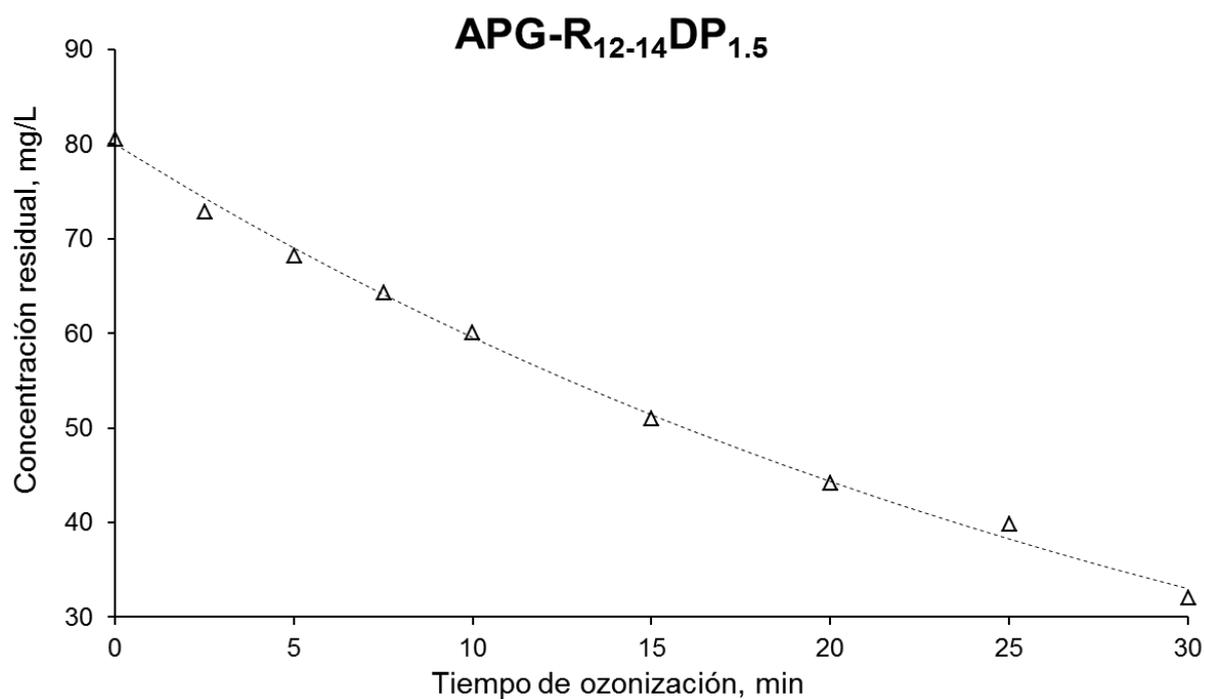


Figura 6.35. Ajuste del modelo cinético propuesto para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

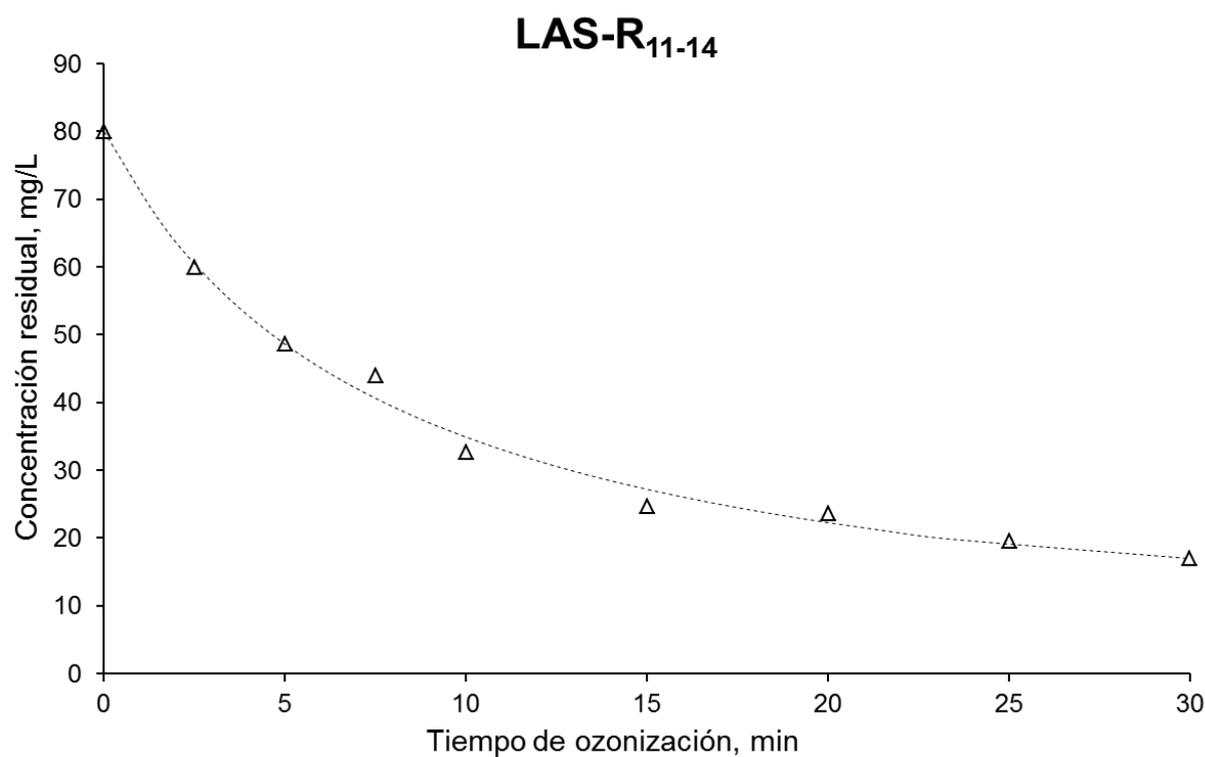


Figura 6.36. Ajuste del modelo cinético propuesto para el LAS-R₁₁₋₁₄

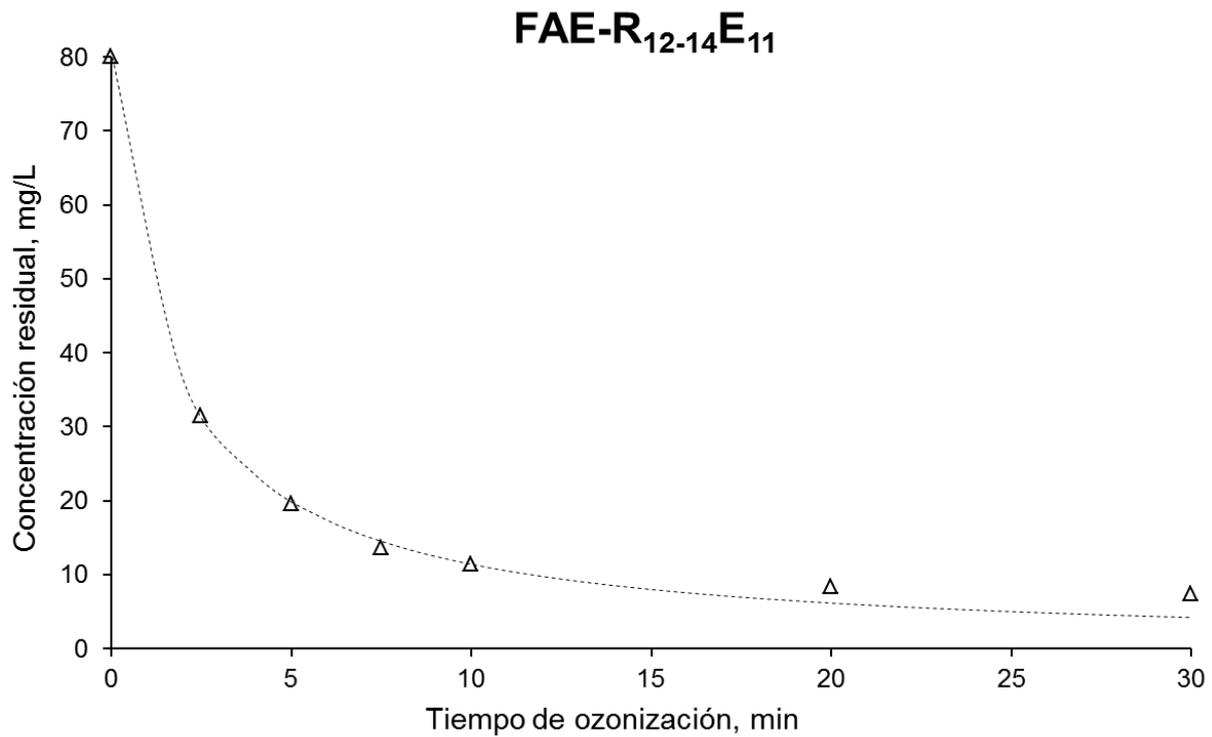


Figura 6.37. Ajuste del modelo cinético propuesto para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

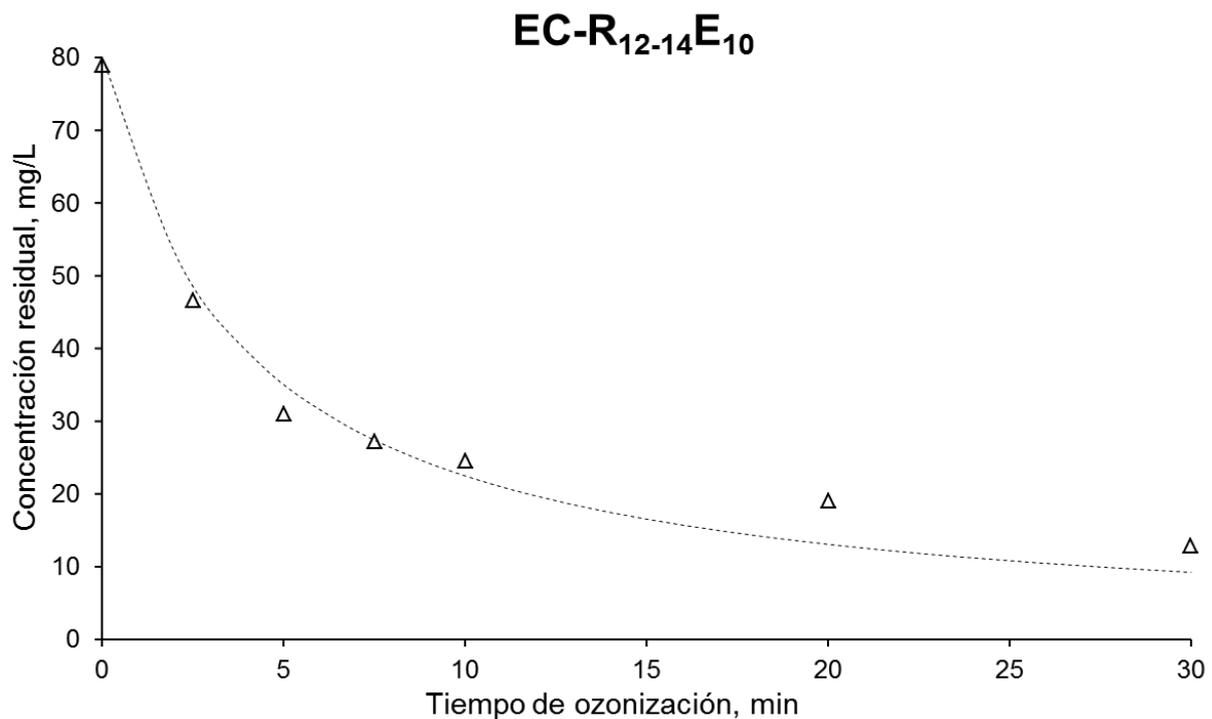


Figura 6.38. Ajuste del modelo cinético propuesto para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Como puede verse en estas tres últimas figuras, los modelos cinéticos propuestos explican bastante bien la cinética de degradación primaria de los tensioactivos ensayados, habiéndose encontrado que para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} el orden de reacción es inferior al resto.

6.3.6. Conclusiones

Comparando el progreso de la ozonización de los tensioactivos ensayados (apartado 6.3), se encuentra que las disoluciones, a igual concentración inicial de tensioactivo, que contienen anillos en sus moléculas (LAS-R₁₁₋₁₄ y APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}), son mucho más resistentes a la descomposición por ozono que compuestos sin anillos aromáticos como el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ o el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀.

La degradación final alcanzada ha resultado mayor en el caso del LAS-R₁₁₋₁₄, como tensioactivo aniónico con anillos aromáticos, respecto del resto del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, como tensioactivo no iónico con anillos glucosídicos. Esto indica una mayor resistencia a la descomposición por ozono de los anillos glucosídicos respecto de los anillos aromáticos.

El ozono molecular, sin tener en cuenta reactivos secundarios producidos por la descomposición del ozono, ataca principalmente a grupos con dobles enlaces como los presentes en los anillos aromáticos del LAS-R₁₁₋₁₄ lo cual justifica por tanto la mayor degradación de éste respecto del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y la diferencia existente en los órdenes de reacción.

El ozono en una primera etapa de la reacción se centra en atacar anillos, como fase anterior a la de formación de reacciones radicalarias (Ledakowicz, 2005), lo cual puede ser el motivo de que se alcancen degradaciones del tensioactivo de partida inferiores en el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y el LAS-R₁₁₋₁₄ debido a una cierta inhibición sobre las reacciones radicalarias caracterizadas por ser más rápidas y poco selectivas (Glance, 1986)

Las diferencias existentes entre tensioactivos sin anillos en su estructura es más compleja de explicar, sugiriéndose realizar análisis de identificación de los productos de la ozonización y productos intermedios en investigaciones posteriores.

Por otro lado y teniendo en cuenta los valores finales de concentración residual alcanzados parece que la presencia del grupo ácido carboxílico en el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ parece ofrecer cierta resistencia a la degradación respecto del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ teniendo en cuenta que ambos poseen más o menos el mismo grado de etoxilación.

6.4. Influencia de la ozonización sobre la biodegradabilidad de tensioactivos

Para el estudio de la biodegradabilidad se ha seleccionado el ensayo estático (apartado 4.5.1) en el que se sigue la evolución de la biodegradación final mediante la medida del carbono orgánico total (apartado 4.3.1.2), con el equipo Shimadzu TOC-V CSH.

Se eligió el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} como tensioactivo de carácter no iónico y el LAS-R₁₁₋₁₄ como tensioactivo aniónico, evaluándose:

- La concentración residual de tensioactivo
- El carbono orgánico disuelto
- La tensión superficial

6.4.1. Parámetros característicos del proceso de biodegradación.

A fin de poder comparar los diferentes ensayos de biodegradación se han definido una serie de parámetros característicos para los perfiles de biodegradación (Jurado, 2007).

El **tiempo de latencia (t_L)** es el tiempo que tardan en aclimatarse los microorganismos no adaptados al nuevo sustrato; suele corresponder con el periodo de tiempo durante el cual se produce un cambio suave de la concentración residual. Para cada ensayo de biodegradación se calcula trazando dos tangentes a la curva de biodegradación para las etapas de adaptación y biodegradación (figura 6.39). El tiempo de latencia es el punto de corte de ambas rectas.

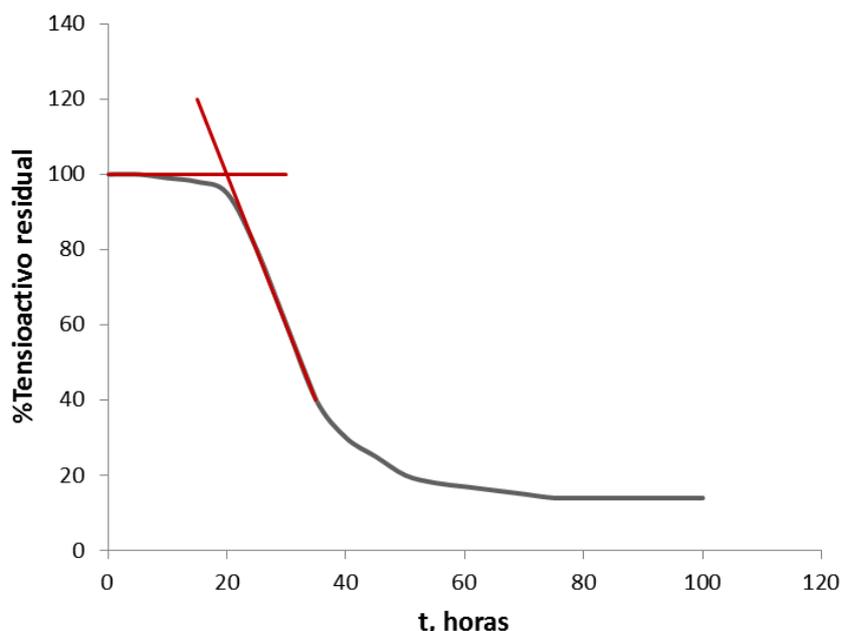


Figura 6.39. Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación

El período de latencia o aclimatación previo al proceso biodegradativo de compuestos orgánicos en el medio acuático puede tener varias causas tales como la falta de nutrientes, la inducción enzimática, predación por protozoos, mutación de especies, el crecimiento de una población microbiana capaz de metabolizar el sustrato, o simplemente la adaptación a la presencia de agentes tóxicos.

El **tiempo de vida media ($t_{1/2}$)** es el tiempo para el cual la concentración de sustrato disminuye a la mitad desde el inicio del proceso de biodegradación. Por lo tanto también se contabiliza el tiempo de latencia. Al igual que el tiempo de latencia, el tiempo de vida media se calcula mediante métodos gráficos sobre la curva de biodegradación.

La **Velocidad media de biodegradación (V_M)** se ha calculado como el cociente entre un porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo transcurrido para alcanzar ese valor de biodegradación. Para que los datos procedentes de los diferentes ensayos sean comparables entre sí, se ha fijado un valor de biodegradación del 50 % y se ha medido el tiempo que tarda en alcanzarse dicho valor de biodegradación. Este parámetro puede dar idea de la rapidez con la que está transcurriendo el proceso de biodegradación, además esta velocidad media por unidad de tiempo permite comparar todos los ensayos.

La **concentración de tensioactivo residual (S_R)** es la concentración que no ha sido degradada por los microorganismos, y representa la concentración de tensioactivo que no es metabolizable. Se calcula como el valor medio de la concentración de tensioactivo al final del ensayo cuando ésta permanece prácticamente constante con el tiempo de biodegradación.

La **biodegradabilidad del tensioactivo (B)** se define como el porcentaje de tensioactivo biodegradado a las 50 horas del ensayo.

6.4.2. Biodegradabilidad primaria.

A continuación se presentan los perfiles de biodegradación primaria obtenidos para los tensioactivos ensayados antes y después de ozonizar durante 15 minutos con un caudal de 5Ln/h de la fase gaseosa con una concentración de ozono en la misma de 113 g/Nm³.

La concentración de tensioactivo se expresa como porcentaje de tensioactivo residual y como porcentaje de biodegradación.

El porcentaje de tensioactivo residual y de biodegradación se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\%Tensioactivo\ residual = \frac{[S]_t}{[S]_0} \cdot 100 \quad [6.14]$$

$$\%Biodegradación = \frac{[S]_0 - [S]_t}{[S]_0} \cdot 100 \quad [6.15]$$

Donde:

- $[S]_t$ es la concentración de sustrato en un instante t
- $[S]_0$ es la concentración de sustrato al inicio del ensayo

Todos los perfiles de biodegradación obtenidos presentan tres fases bien diferenciadas:

1. Fase de aclimatación de los microorganismos, caracterizada porque la concentración de tensioactivo se mantiene prácticamente constante. En esta primera etapa, y debido a la acumulación y adsorción del tensioactivo en las interfases, se observan algunas variaciones de la concentración de tensioactivo residual.
2. Disminución rápida de la concentración de tensioactivo debido a la metabolización por parte de los microorganismos del mismo.
3. Período donde la concentración de tensioactivo residual permanece prácticamente constante, aunque puede continuar la biodegradación de los metabolitos producidos durante el proceso de biodegradación.

A continuación se muestran los resultados y discusión sobre los tensioactivos ensayados.

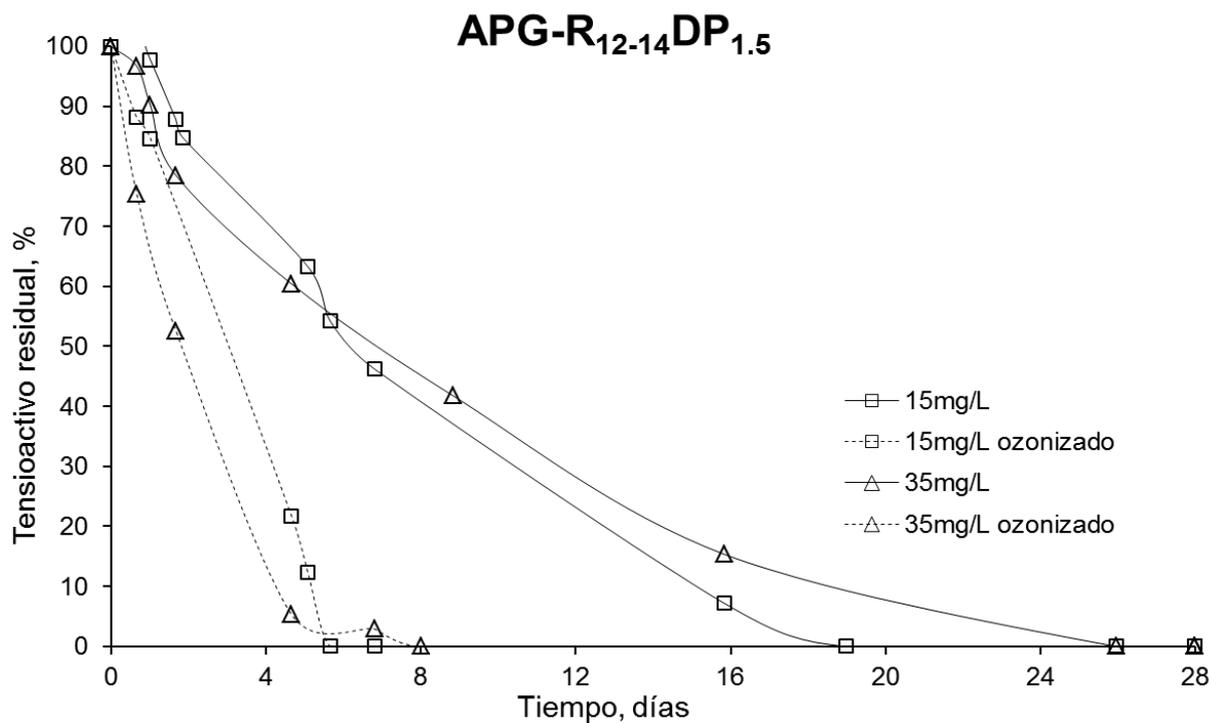
APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.40. Tensioactivo residual en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

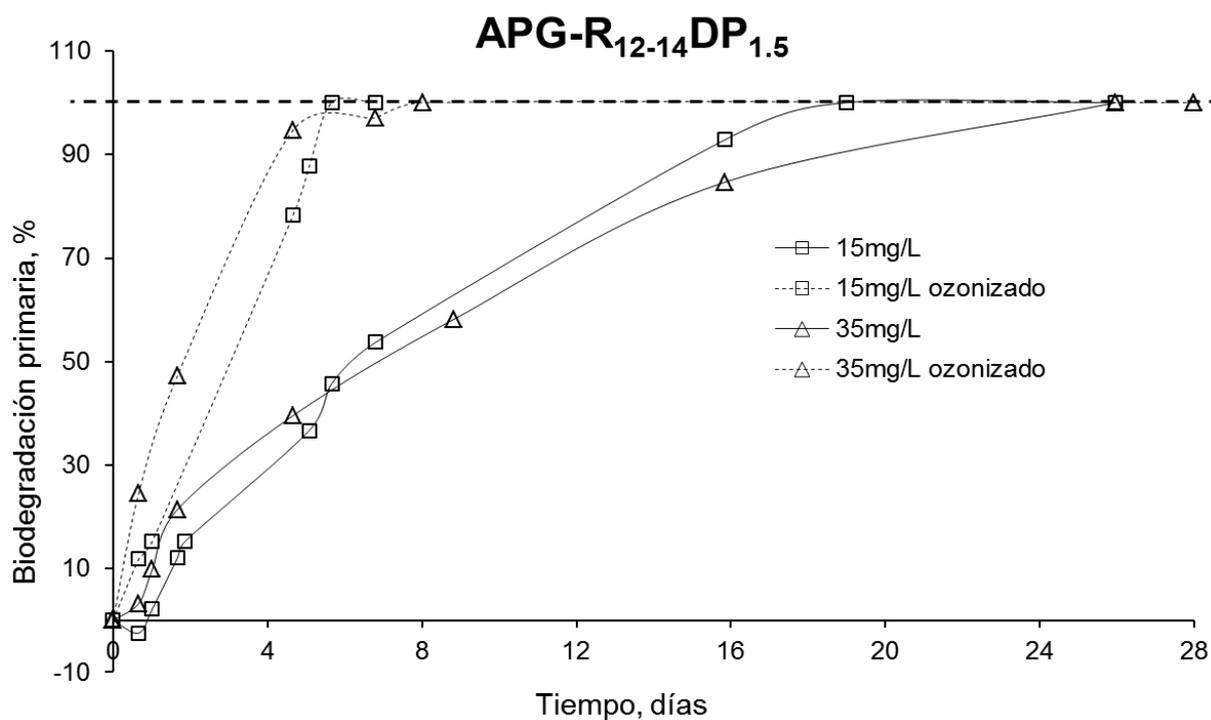


Figura 6.41. Biodegradación primaria en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

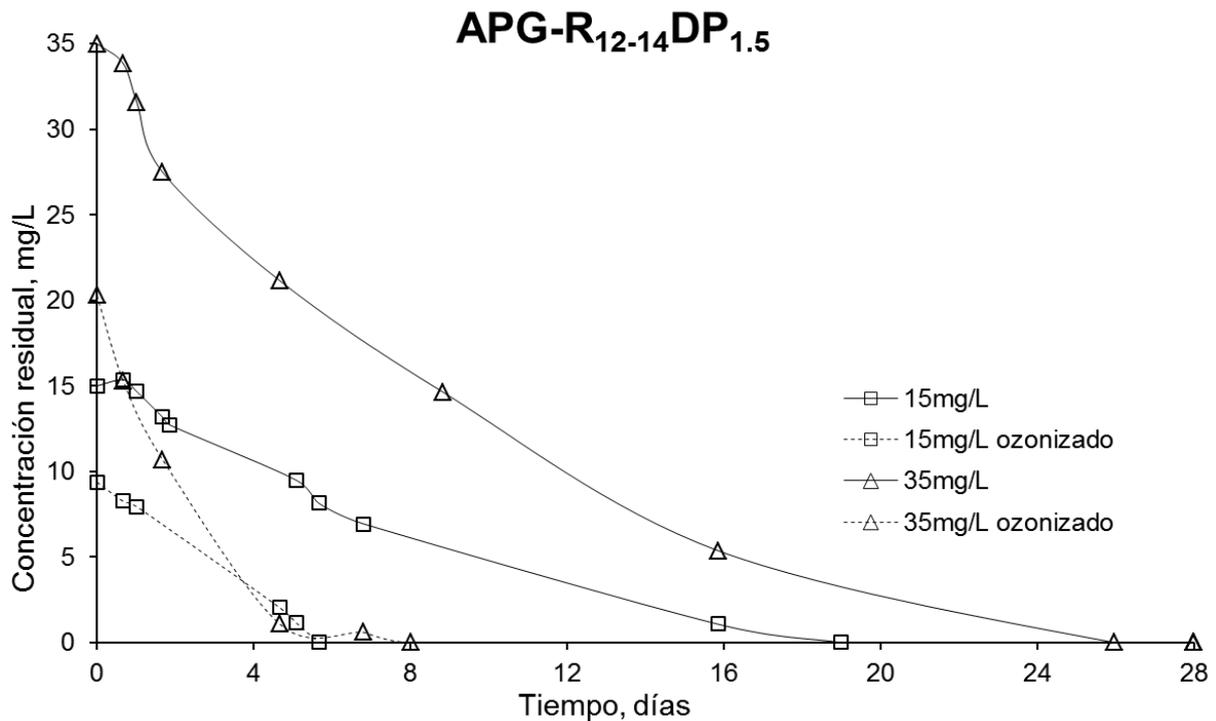


Figura 6.42. Concentración residual de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} en el ensayo estático para concentraciones por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Para este tensioactivo en concreto se observa como tras ozonizar, la biodegradabilidad aumenta considerablemente requiriéndose en torno a un 25% del tiempo necesario para alcanzar una biodegradabilidad primaria del 100% respecto del tensioactivo sin ozonizar. Esto en parte es motivado por el descenso de la concentración de tensioactivo de partida como efecto de la ozonización, como puede verse en la figura 6.42.

En la figura 6.41 se observa como, tanto para valores de concentración por encima y por debajo de la CMC, para el tensioactivo APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} la velocidad media de biodegradación primaria aumenta tras ozonizar.

Puede decirse por tanto que para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} la ozonización influye positivamente en este aspecto, ya que aumenta la velocidad media de biodegradación del tensioactivo y disminuye su tiempo de vida media. Esto parece indicar que existe una sinergia en la biodegradación primaria del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} provocada por los subproductos de la ozonización.

La biodegradación está también influenciada simultáneamente por otros parámetros tales como la CMC. En este caso el ensayo con una concentración de tensioactivo por encima de la CMC (28,88 mg/L) presenta mayor biodegradabilidad primaria.

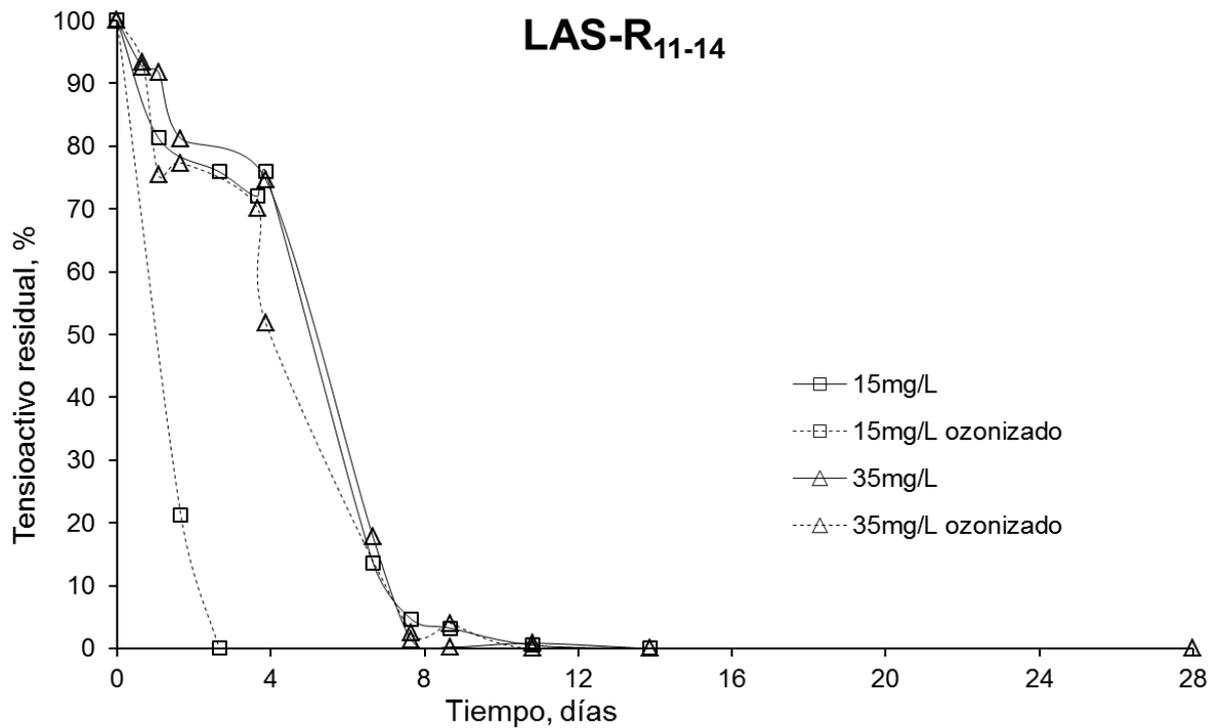
LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.43. %Tensioactivo residual en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

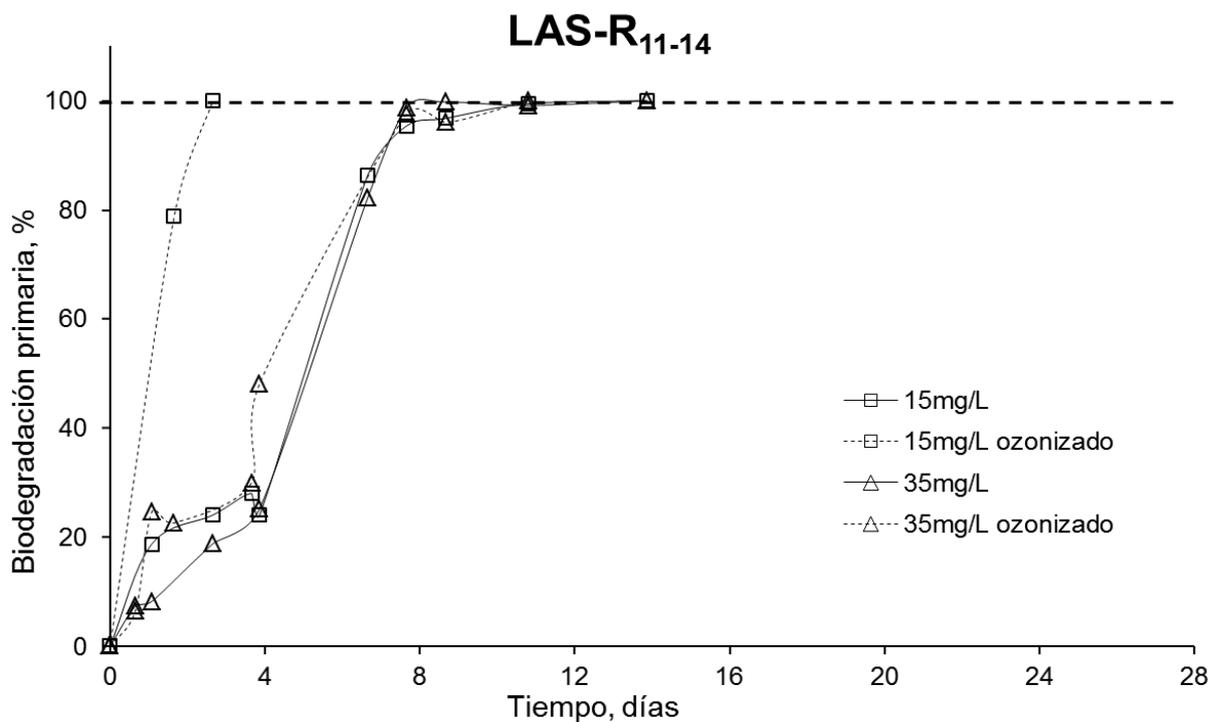


Figura 6.44. %Biodegradación primaria en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

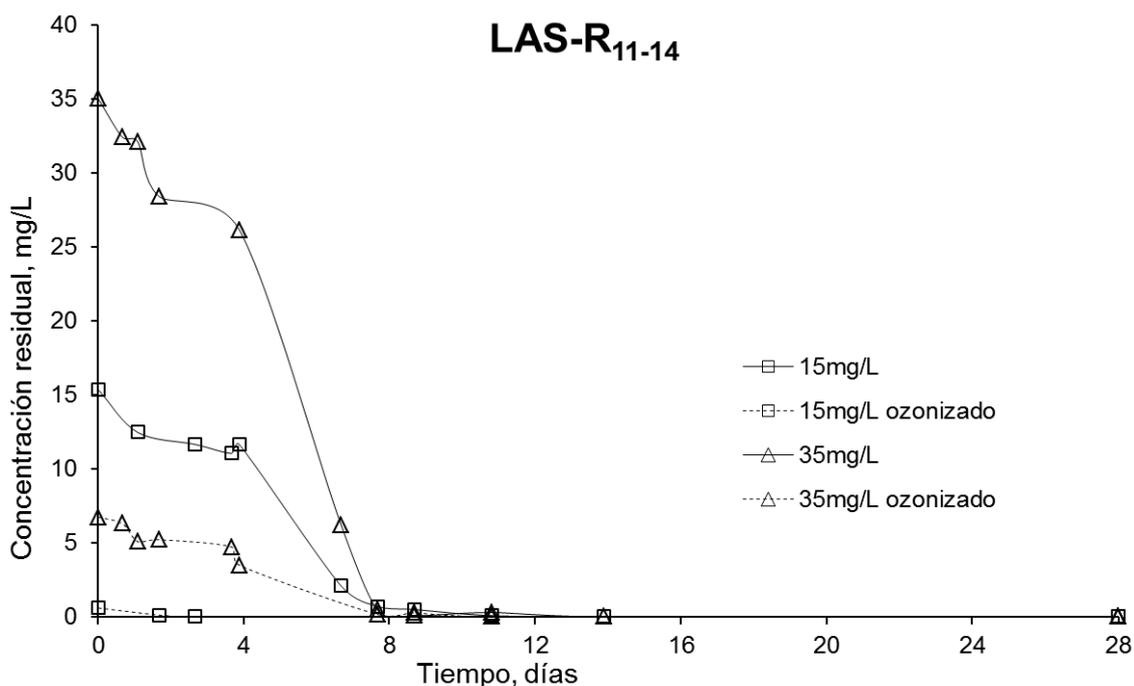


Figura 6.45. Concentración residual de LAS-R₁₁₋₁₄ en el ensayo estático para concentraciones por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Para este tensioactivo en concreto se observa como tras ozonizar, la biodegradabilidad aumenta considerablemente requiriéndose en torno a un 37,5% del tiempo necesario para alcanzar una biodegradabilidad primaria del 100% respecto del tensioactivo sin ozonizar para una concentración inicial de 15 mg/L. Esto en parte es motivado por el descenso de la concentración de tensioactivo de partida como efecto de la ozonización, como puede verse en la figura 6.45.

En la figura 6.43 se observa como en este caso, sólo para valores de concentración por debajo de la CMC, la velocidad media de biodegradación primaria aumenta tras ozonizar.

Puede decirse por tanto que para el LAS-R₁₁₋₁₄ la ozonización influye positivamente en este aspecto, ya que aumenta la velocidad media de biodegradación del tensioactivo y disminuye su tiempo de vida media. Esto parece indicar que existe una sinergia en la biodegradación primaria del LAS-R₁₁₋₁₄ provocada por los subproductos de la ozonización cuando la concentración inicial es inferior a la CMC.

En este caso el ensayo con una concentración de tensioactivo por encima de la CMC (25,51 mg/L) no presenta un notable aumento de la biodegradabilidad, pero al menos no se ve disminuida tras la ozonización.

Habrà que fijarse por tanto en su biodegradación última (apartado 6.4.3) para concluir el efecto existente, sobre la biodegradación, al ozonizar por encima de la CMC

6.4.3. Biodegradabilidad última.

A continuación se presentan los perfiles de biodegradación final obtenidos para los tensioactivos ensayados. La evolución de la concentración se expresa como COD residual y como porcentaje de biodegradación final alcanzado.

La concentración de carbono orgánico total residual y la biodegradación final se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\%COD_{residual} = \frac{[COD]_t}{[COD]_0} \cdot 100 \quad [6.16]$$

$$\%Biodegradación\ última = \frac{[COD]_0 - [COD]_t}{[COD]_0} \quad [6.17]$$

Donde:

- $[COD]_t$ es la concentración de carbono orgánico total en un instante t
- $[COD]_0$ es la concentración de carbono orgánico total al comienzo del ensayo

Todos los perfiles de biodegradación final obtenidos presentan tres fases bien diferenciadas:

1. Fase de aclimatación de los microorganismos, caracterizada porque la concentración se mantiene prácticamente constante o experimenta un ligero aumento. En esta primera etapa, y debido a la acumulación y adsorción del tensioactivo en las interfases, se observan algunas variaciones de la concentración de tensioactivo residual.
2. Disminución rápida de la concentración debido a la metabolización por parte de los microorganismos.
3. Período donde la concentración residual permanece prácticamente constante.

Se ha encontrado que para todos los tensioactivos a las concentraciones ensayadas, el porcentaje de biodegradación final alcanzado es superior al 60 %. La legislación vigente (Reglamento CE nº 648, 2004) exige que se alcance un nivel mínimo del 60 % de biodegradación final antes de 28 días cuando se aplica uno de los métodos recogidos en el Anexo III del Reglamento (CE) nº 648/2004. Si cumple con esta condición el tensioactivo puede considerarse como biodegradable.

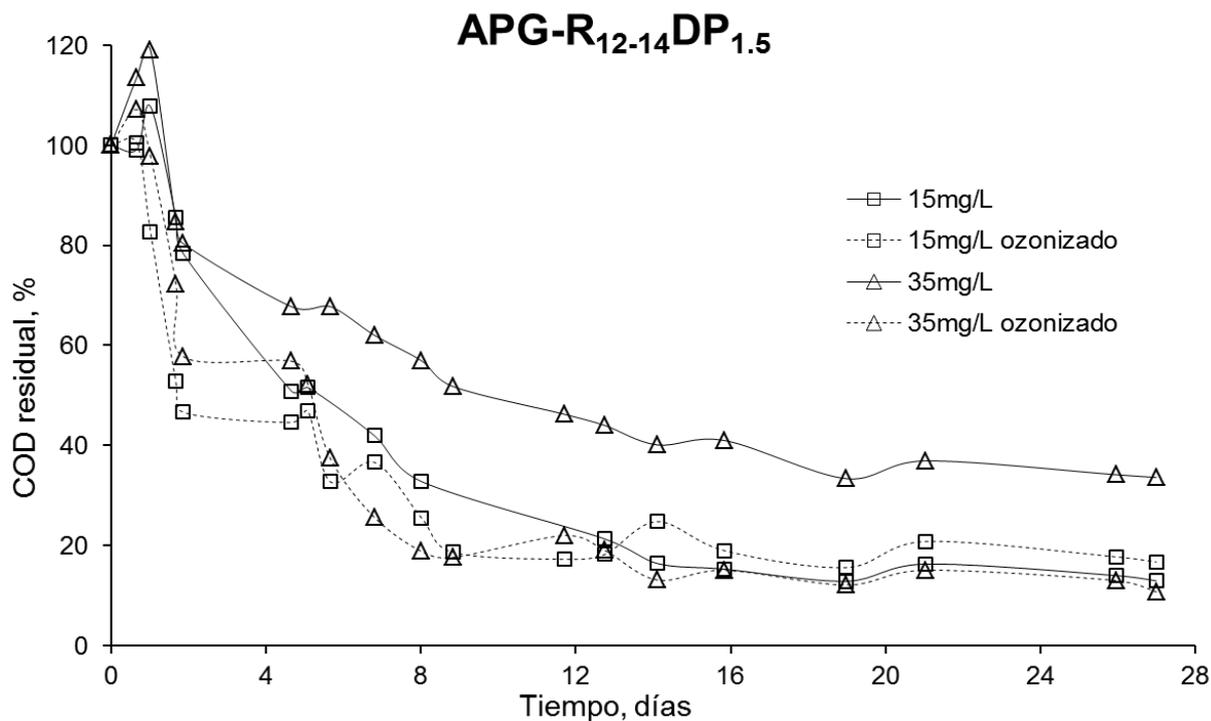
APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.46. %COD residual en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

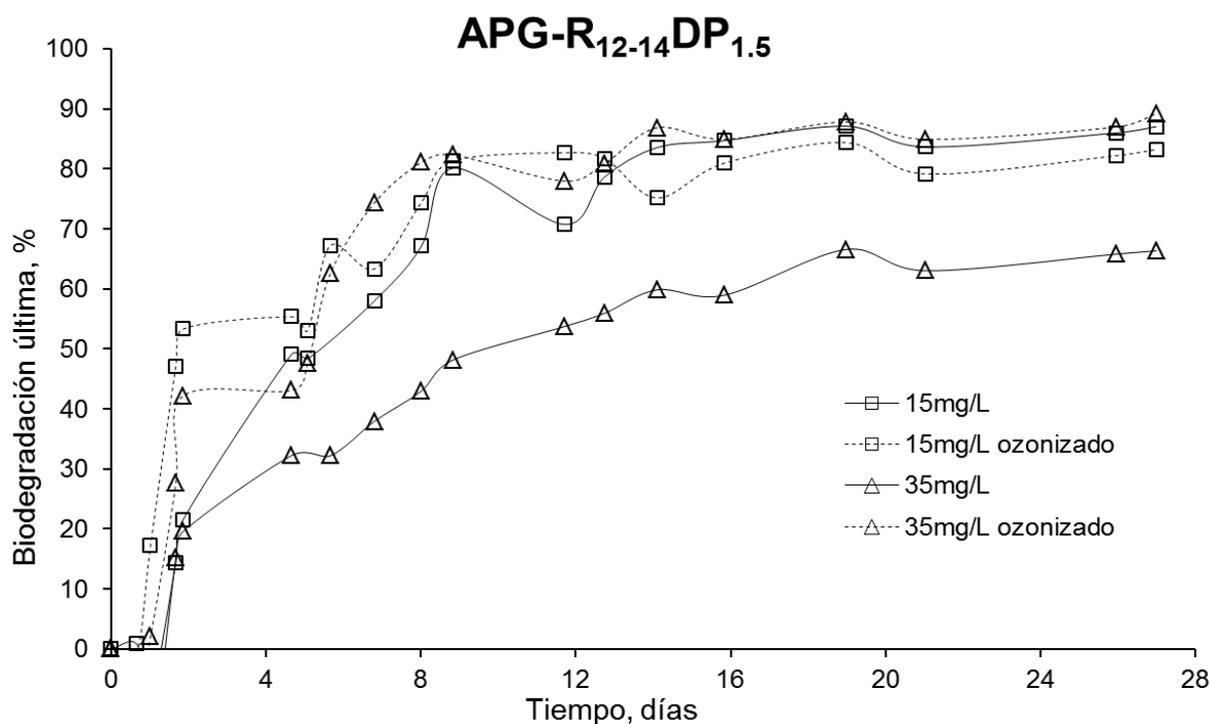


Figura 6.47. %Biodegradación última en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Para este tensioactivo se aprecia como la biodegradación última de las muestras ozonizadas aumenta inicialmente, para el ensayo por debajo de la CMC (28,88 mg/L) más que para el ensayo por encima de la CMC, respecto de las muestras sin ozonizar.

Tabla 6.12. Valores de mineralización a distintos tiempos para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} en el ensayo estático de biodegradación.

APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}				
	[T] ₀ , mg/L	% Min. 4h	% Min. 5h	% Final Min.
Biodegradación	15	54	62	85.97
	35	28	33	65.47
Biodegradación	15	56	63	82.27
+ Ozonización	35	49	58	87.27

Sin embargo, y como puede verse en la tabla 6.12, a tiempos por encima de los 10 días se aprecia como esta tendencia se invierte siendo la muestra ozonizada por encima de la CMC la que presenta un mayor incremento de la biodegradación respecto de la muestra sin ozonizar.

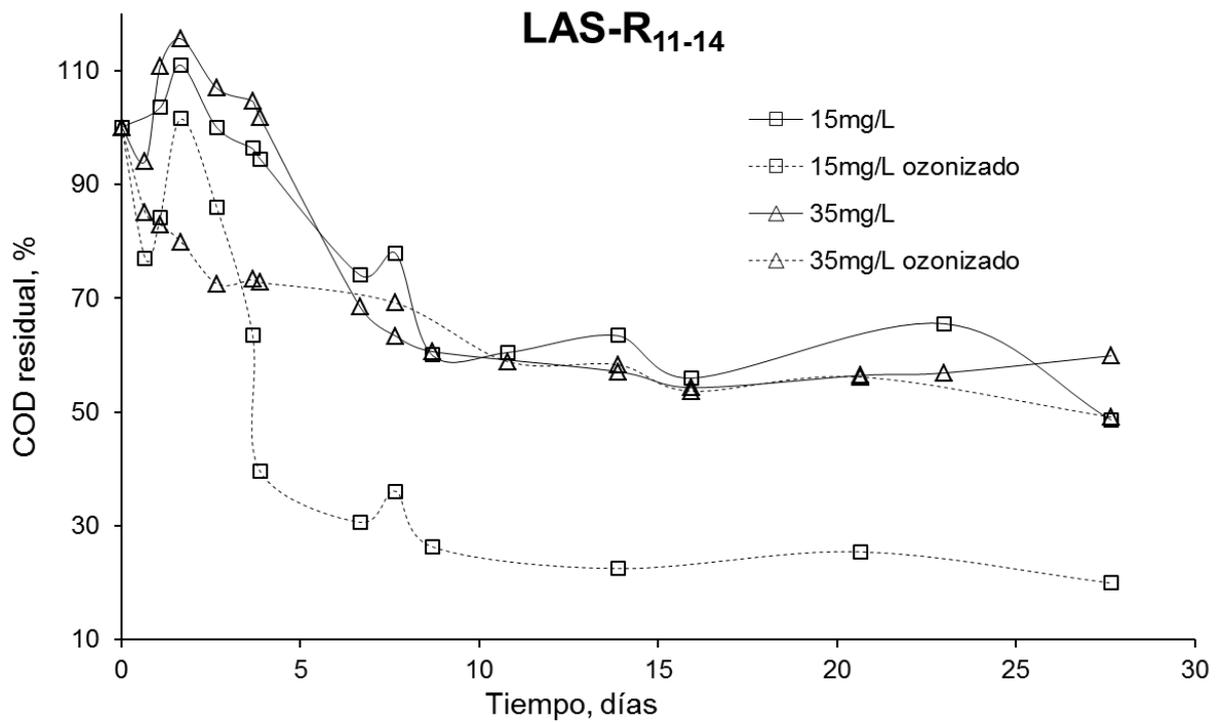
LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.48 % COD residual en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

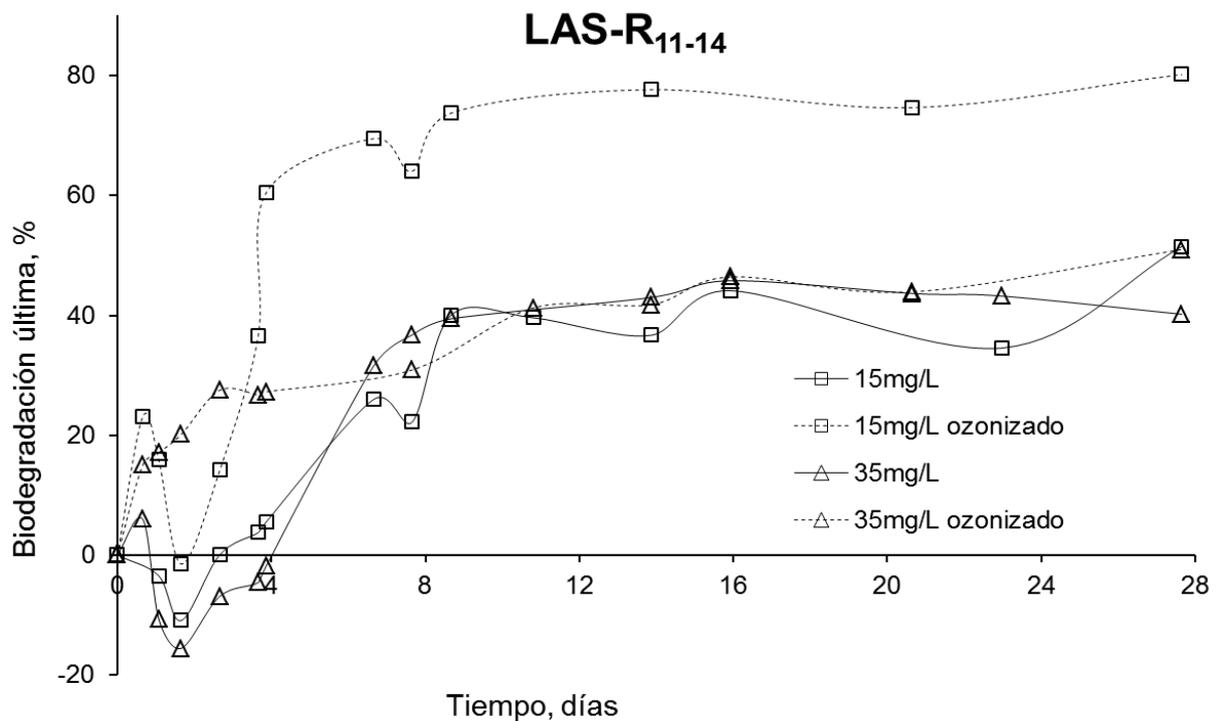


Figura 6.49 %Biodegradación última en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Para este tensioactivo se aprecia como la biodegradación última de las muestras ozonizadas aumenta inicialmente, para el ensayo por debajo de la CMC (25,47 mg/L) más que para el ensayo por encima de la CMC, respecto de las muestras sin ozonizar como puede verse en la tabla 6.13.

Tabla 6.13. Valores de mineralización a distintos tiempo para el LAS-R₁₁₋₁₄ en el ensayo estático de biodegradación.

LAS-R ₁₁₋₁₄				
	[T] ₀ , mg/L	% Min. 4h	% Min. 5h	% Final Min.
Biodegradación	15	7	12	43.34
	35	5	10	43.17
Biodegradación + Ozonización	15	43	50	77.43
	35	29	31	45.73

Observando los datos recogidos en la tabla 6.13 se aprecia como se mantiene la tendencia a aumentar la biodegradación final, más para la muestra ozonizada por debajo de la CMC, respecto de la muestra sin ozonizar, que la muestra por encima de la CMC.

6.4.4. Parámetros característicos del proceso de biodegradación calculados

En la tabla 6.14 se muestran los anteriores parámetros característicos, descritos en el apartado 6.4.1, calculados para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 6.14. Parámetros característicos del proceso de biodegradación en el ensayo estático para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y para el LAS-R₁₁₋₁₄

APG-R ₁₂₋₁₄ DP _{1.5}						
	S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	V _M , %/h	B, %	Min, %
Biodegradación	15	23	142	0.352	22	85.97
	35	16	108	0.463	15	65.47
Biodegradación + ozonización	15	--	72	0.694	90	82.27
	35	--	43	1.163	23	87.27

LAS-R ₁₁₋₁₄						
	S ₀ , mg/L	t _L , h	t _{1/2} , h	V _M , %/h	B, %	Min, %
Biodegradación	15	86	125	0.400	15	43.34
	35	53	130	0.385	29	43.17
Biodegradación + ozonización	15	--	24	2.083	33	77.43
	35	58	99	0.508	55	45.73

Se observa como para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} la ozonización reduce el tiempo de vida media del tensioactivo, siendo de un 50,7% para la concentración por debajo de la CMC (28,88mg/L) y un 39,8% para la concentración por encima de la CMC respecto del tiempo de vida medio para la biodegradación alcanzada sin ozonizar.

Para el LAS-R₁₁₋₁₄ se observa una reducción en el tiempo de vida media del tensioactivo hasta un 19,2%, para la concentración inicial por debajo de la CMC (25,47mg/L); y hasta un 76,15% para la concentración inicial por encima de la CMC; respecto del tiempo de vida media para la biodegradación alcanzada en ambos casos sin ozonizar.

Puede establecerse por tanto que la reducción del tiempo de vida media tras la ozonización se acentúa más en el caso de estar el tensioactivo aniónico de partida por debajo de la CMC y el tensioactivo no iónico por encima de la CMC.

Respecto a la mineralización final alcanzada se aprecia como para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, no se observa una variación significativa por debajo de la CMC, alcanzándose valores relativamente altos de mineralización; y encontrándose que para valores por encima de la CMC, disminuye la mineralización en la muestra sin ozonizar, produciéndose un aumento de la mineralización alcanzada en la muestra ozonizada.

Respecto a la mineralización final alcanzada se aprecia como para el LAS-R₁₁₋₁₄, no se observa una variación significativa por encima de la CMC, alcanzándose valores relativamente bajos de mineralización; y encontrándose que para valores por debajo de la CMC, se produce un aumento de la mineralización alcanzada en la muestra ozonizada respecto de la no ozonizada.

Esto puede estar relacionado con la presencia de tensioactivo residual en el medio, el cual puede ejercer un efecto inhibitorio pese a que el tensioactivo libre presente en el medio (fuente de carbono para los microorganismos responsables de este proceso) depende de la CMC (Jurado, 2007).

6.4.5. Conclusiones

Para los dos grupos de tensioactivos ensayados (aniónicos, LAS-R₁₁₋₁₄; y no iónicos, APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}) se ha encontrado que la ozonización induce una reducción del tiempo de vida media del tensioactivo de partida (tabla 6.12). Dicha reducción se acentúa más en el caso de estar el tensioactivo aniónico de partida por debajo de la CMC y el tensioactivo no iónico por encima de la CMC.

La mineralización final alcanzada es superior en el caso del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, aumentando para tensioactivos no iónicos por encima de la CMC y para tensioactivos aniónicos por debajo de la CMC.

El APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} presenta un mayor aumento de la biodegradación, tanto primaria como última, tras ser ozonizado.

6.5. Influencia de la ozonización sobre la toxicidad de tensioactivos

Se han utilizado los ensayos de inhibición con bacterias *Vibrio fischeri* y con bacterias *Pseudomona putida* para evaluar el grado de toxicidad de los tensioactivos, antes y después de ozonizar, tal como aparece recogido en el apartado 4.4.

6.5.1 Inhibición del crecimiento sobre bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri*

El ensayo con bacterias bioluminiscentes *V.fischeri* y el cálculo de la EC_{50} a un tiempo de 15 minutos están recogidos en el apartado 4.4.1. Del mismo modo los correspondientes resultados de los ensayos realizados quedan recogidos en el apartado 5.6.

Los valores de EC_{50} calculados para distintos tiempos de ozonización, no se corresponden con la concentración de tensioactivo presente, pues este se ve degradado a medida que se expone a la ozonización, aumentando el número de productos existentes en la muestra.

Se ha representado por tanto la inversa del factor de dilución, de la muestra sometida a ensayo, midiendo la inhibición provocada sobre la intensidad lumínica desprendida por las bacterias *V.fischeri*, y se ha procedido a ajustarlo a la ecuación modificada 6.18 análoga a la ecuación 4.8. Cuanto mayor sea el factor de dilución, mayor será la toxicidad de la muestra.

$$\log(1/F) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a) \quad \text{[6.18]}$$

A continuación se muestran las distintas linealizaciones de la inversa del factor de dilución aplicado a la muestra y la función Gamma obtenidas para los tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Los puntos representan los resultados experimentales (valores medios de dos réplicas) y la línea el ajuste de la ecuación 6.18 a los datos, para los tensioactivos APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, LAS-R₁₁₋₁₄ y FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ antes y después de ser ozonizados, según el procedimiento descrito en el apartado 4.2.2.1, usando concentraciones iniciales de tensioactivo de 80mg/L según lo discutido en el apartado 6.3 y con un caudal de 5 Ln/h de ozono, con un 75% de ozono y 25% de oxígeno; y a una temperatura de 25°C.

Posteriormente, para relacionar el efecto que ha tenido la ozonización sobre la toxicidad, se ha representado el factor de dilución de la muestra sometida a ensayo que induce una inhibición del 50% sobre las bacterias *V.fischeri*, así como el valor de EC_{50} correspondiente al tensioactivo de partida. Cuanto mayor sea el factor de dilución, mayor será la toxicidad de la muestra.

Puesto que en análisis previos de toxicidad con tensioactivos sin ozonizar, se usaron concentraciones distintas a las empleadas en los ensayos de ozonización, el valor a tiempo 0 del factor de dilución se ha calculado como el equivalente al que produciría una inhibición del 50% teniendo en cuenta una concentración de muestra de 80 mg/L similar a la usada en los ensayos de ozonización.

6.5.1.1. APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

En la figura 6.50 se muestran las distintas linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

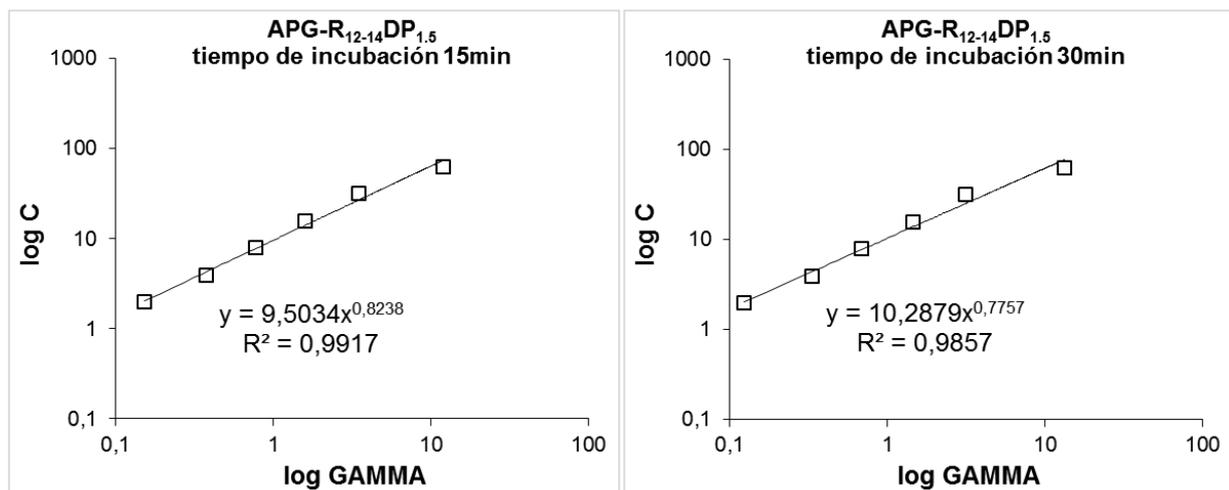


Figura 6.50. Graficas de concentración – función Gamma para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

De la figura 6.50 se obtiene el valor de EC₅₀ del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar, equivalente a una concentración de 9,50mg/L.

El factor de dilución equivalente al que produciría una inhibición del 50% teniendo en cuenta una concentración de muestra de 80 mg/L similar a la usada en los ensayos de ozonización sería de 8,421.

A continuación, en la figura 6.51, se muestran las distintas linealizaciones de la inversa del factor de dilución aplicado a la muestra y la función Gamma obtenidas para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} a distintos tiempo de ozonización y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

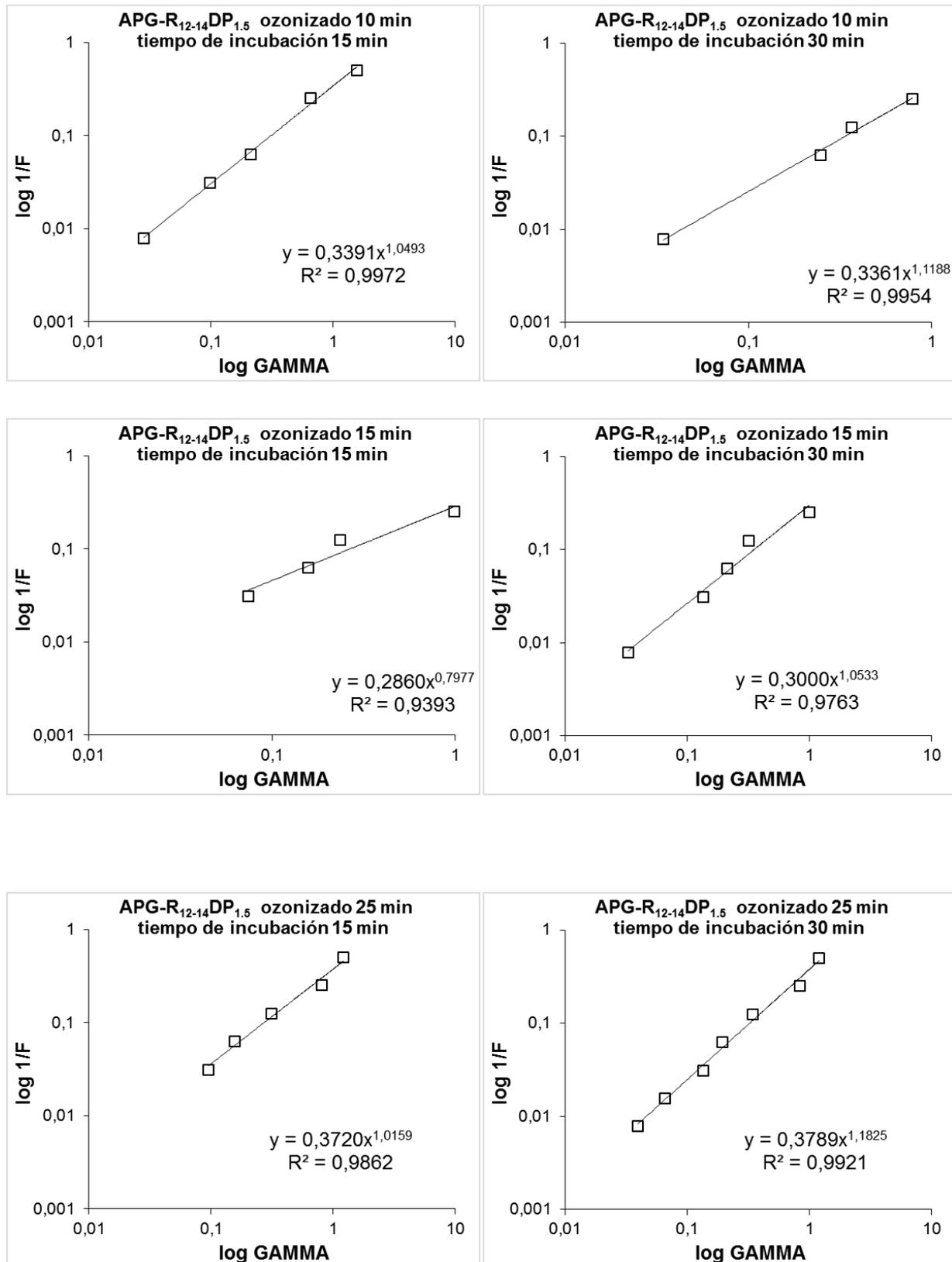


Figura 6.51. Graficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

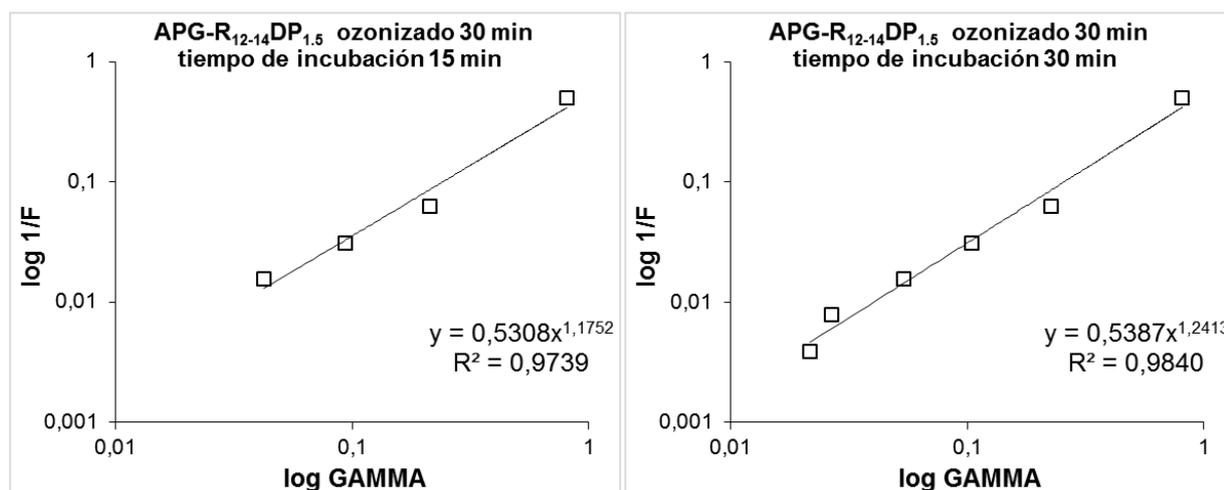


Figura 6.51. (Continuación) Graficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

En la tabla 6.15 se muestra la evolución de la EC₅₀ para un tiempo de incubación de 15 minutos a diferentes tiempos de ozonización para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 6.15. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tiempo de ozonizado, min	EC ₅₀ , mg/L
0	9,50
10	27,13
15	22,88
25	29,76
30	42,46

Para este tensioactivo se encontró una clara tendencia a disminuir su toxicidad a medida que aumentaba su exposición a la ozonización, como puede deducirse de la figura 6.52 de la disminución del factor de dilución necesario para que se induzca una inhibición sobre el crecimiento de las bacterias *V.fischeri* del 50%

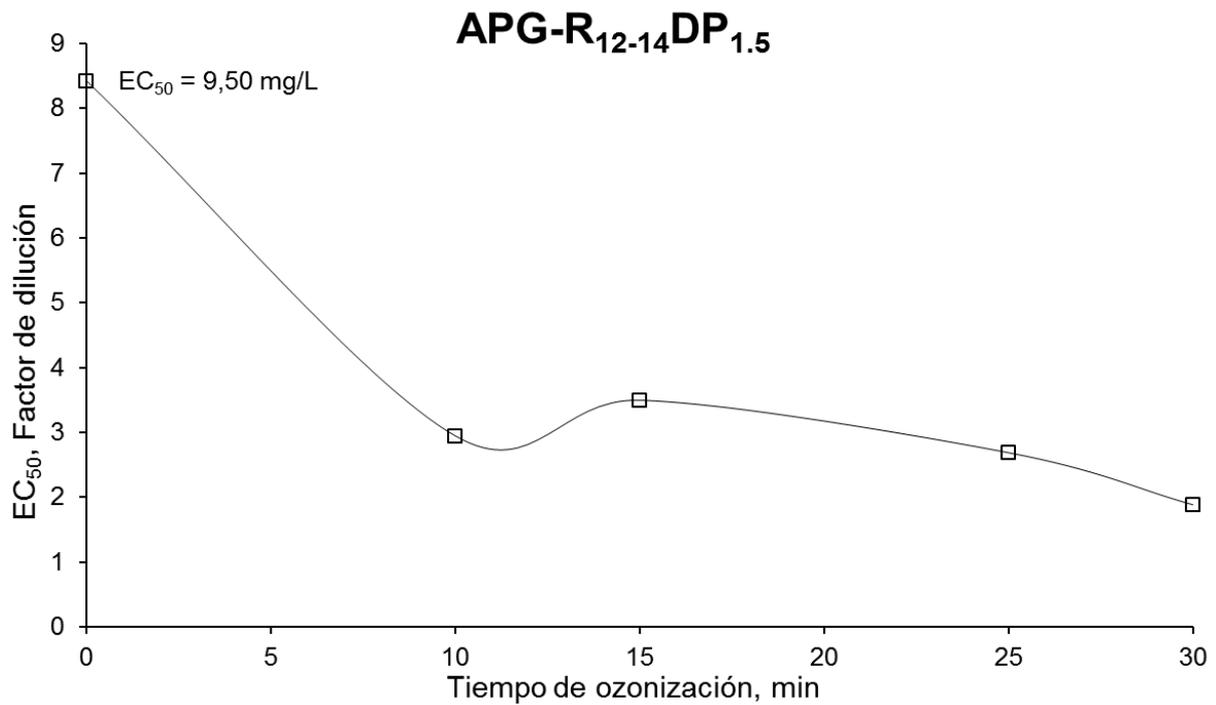


Figura 6.52 Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

La toxicidad alcanzada a los 30 minutos de ozonización resulta un 350% inferior a la existente sin ozonizar.

6.5.1.2. LAS-R₁₁₋₁₄

En la figura 6.53 se muestran las distintas linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para el LAS-R₁₁₋₁₄ a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

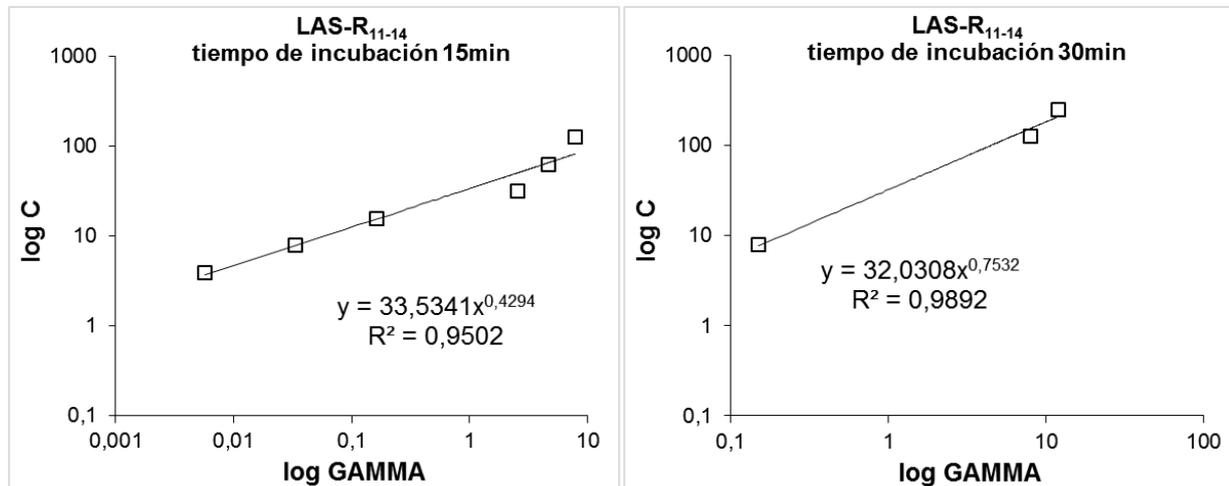


Figura 6.53. Gráficas de concentración – función Gamma para el LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

De la figura 6.53 se obtiene el valor de EC₅₀ del LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar, equivalente a una concentración de 33,53 mg/L.

El factor de dilución equivalente al que produciría una inhibición del 50% teniendo en cuenta una concentración de muestra de 80 mg/L similar a la usada en los ensayos de ozonización sería de 2,386.

A continuación, en la figura 6.54, se muestran las distintas linealizaciones de la inversa del factor de dilución aplicado a la muestra y la función Gamma obtenidas para el LAS-R₁₁₋₁₄ a distintos tiempo de ozonización y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

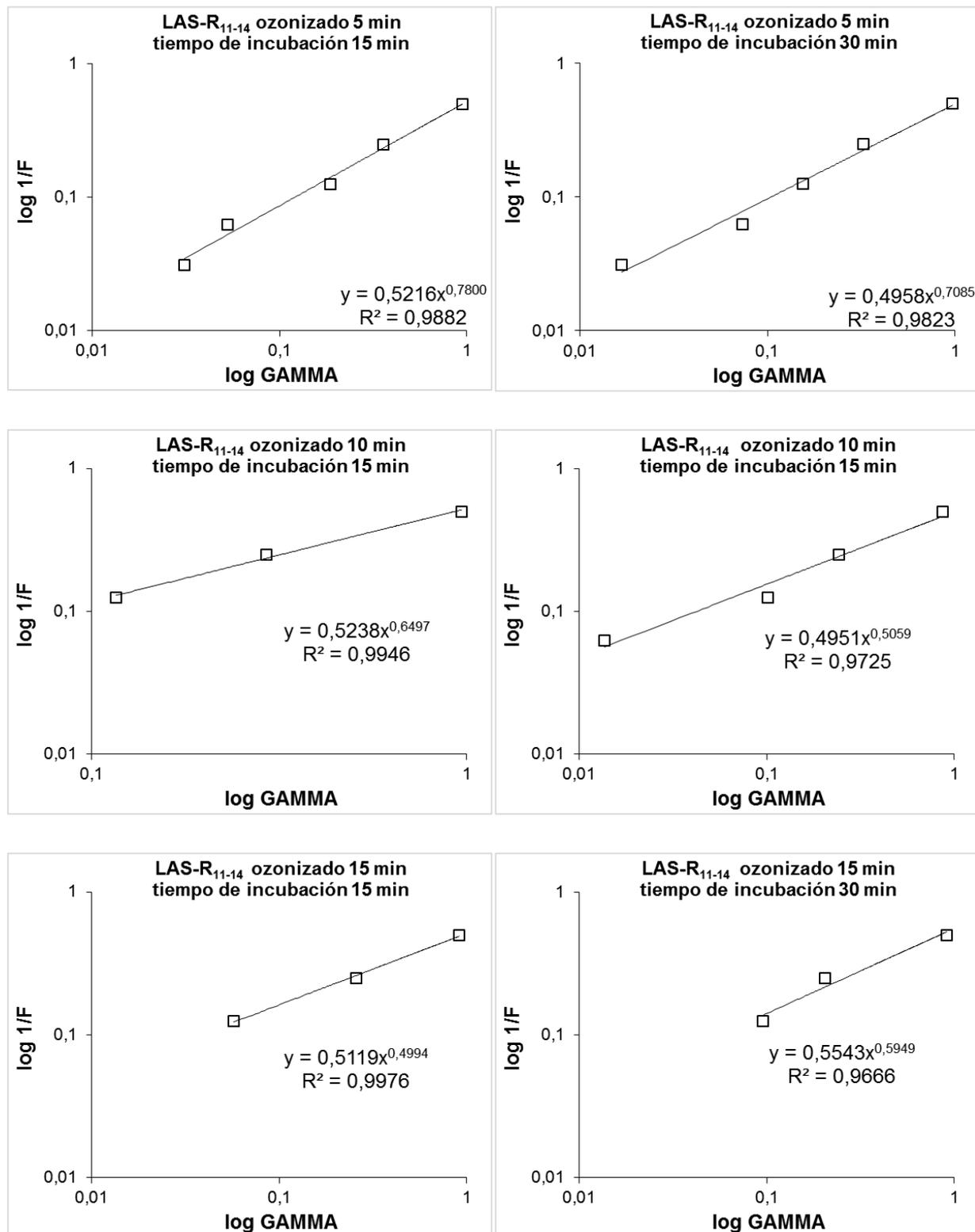


Figura 6.54. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

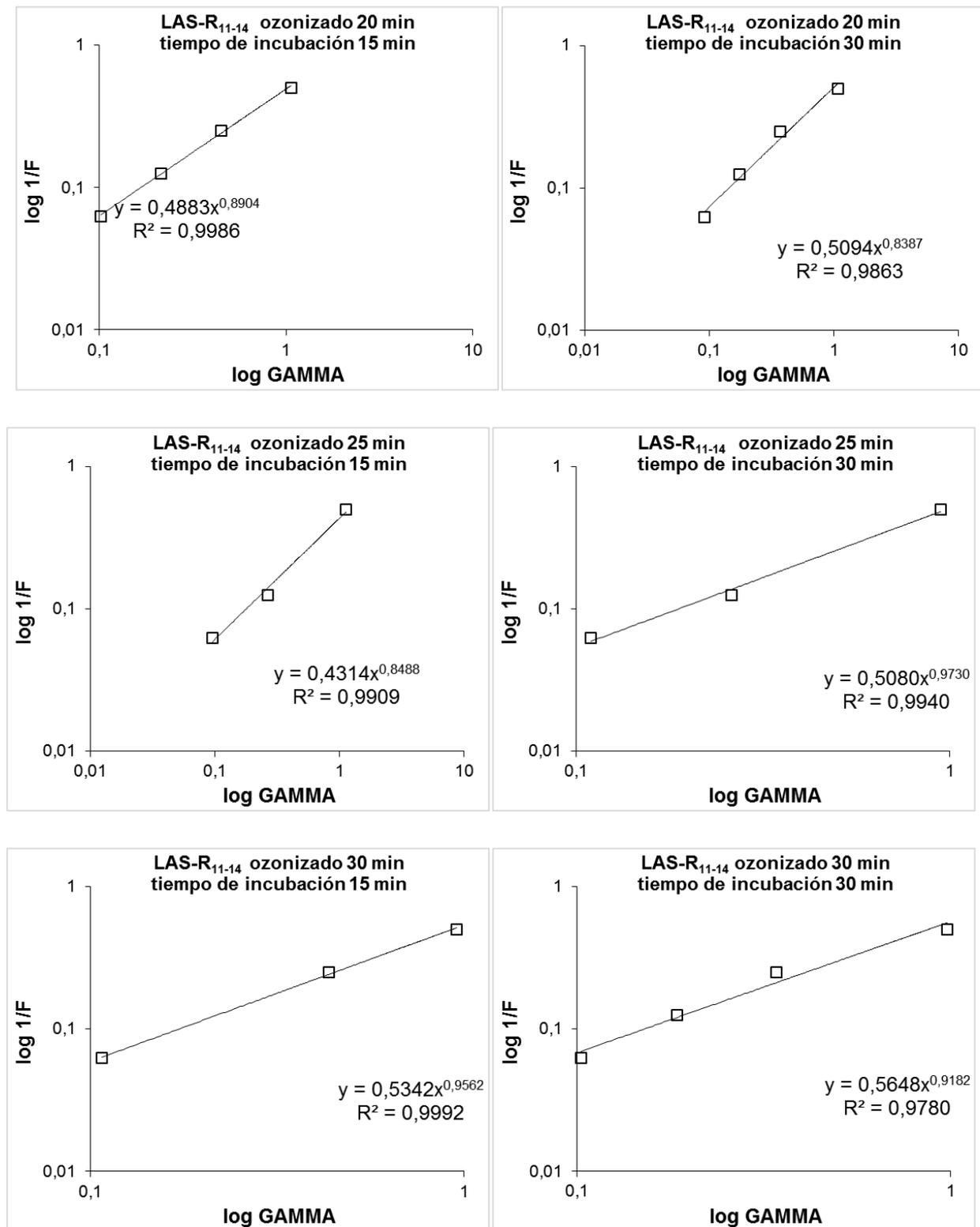


Figura 6.54. (Continuación) Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

En la tabla 6.16 se muestra la evolución de la EC₅₀ para un tiempo de incubación de 15 minutos a diferentes tiempos de ozonización para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 6.16. Evolución de la EC_{50} a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tiempo de ozonizado, min	EC_{50} , mg/L
0	33,53
5	41,72
10	41,90
15	40,95
20	39,06
25	34,51
30	42,73

Para este tensioactivo se encontró una tendencia no tan clara a disminuir su toxicidad a medida que aumentaba su exposición a la ozonización, como puede verse en las variaciones del factor de dilución necesario (figura 6.55) para que se induzca una inhibición sobre el crecimiento de las bacterias *V.fischeri* del 50%.

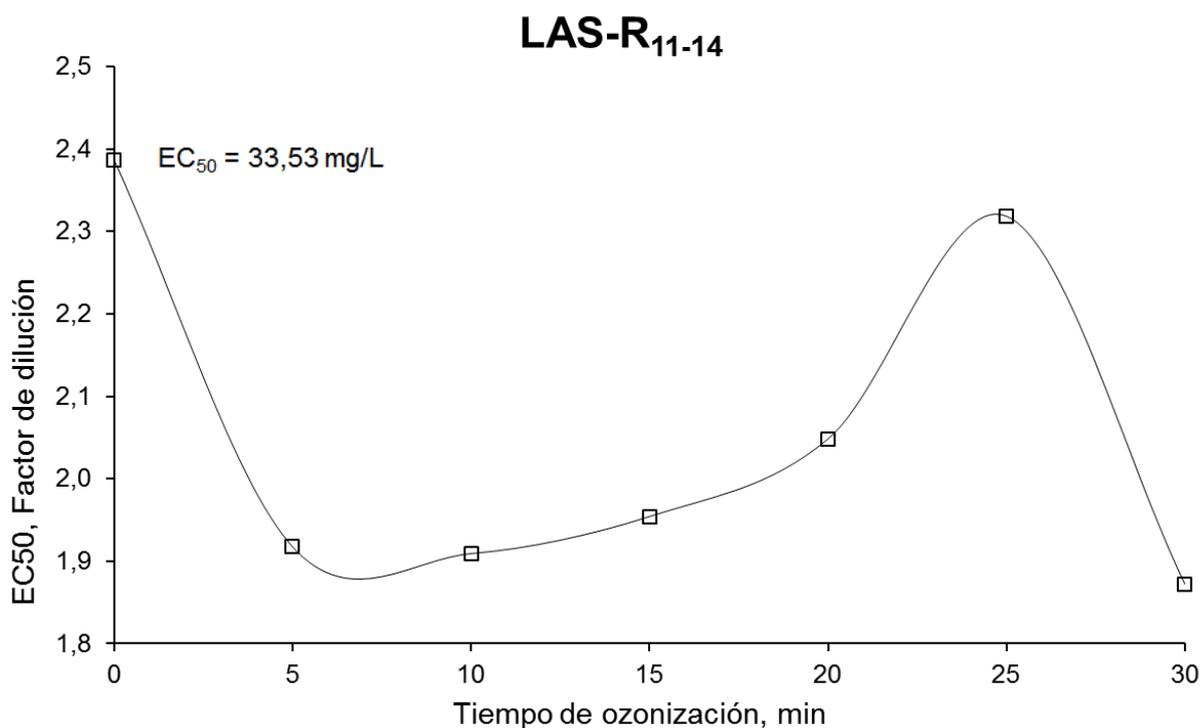


Figura 6.55. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC_{50} a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

En la figura 6.55 se observa un descenso inicial de la toxicidad seguido de un aumento hasta un máximo relativo en torno a los 25 minutos, a continuación se muestran un nuevo descenso de la misma.

El aumento de la toxicidad a los 25 minutos ha de deberse, con total seguridad, a la aparición de productos intermedios en la degradación del tensioactivo con una elevada toxicidad.

En el apartado 6.2.2 se observó como había un máximo relativo inicial en la tensión superficial seguido de un mínimo relativo en torno a los 20 minutos, en la curva de ozonización análoga a las condiciones utilizadas en la ozonización de los ensayos de inhibición. Dicha aparición de un mínimo relativo de tensión superficial justifica el aumento de toxicidad encontrado en torno a los 25 minutos, debido a la influencia que tiene sobre la toxicidad (Hisano, 2010).

6.5.1.3. FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

En la figura 6.56 se muestran las distintas linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

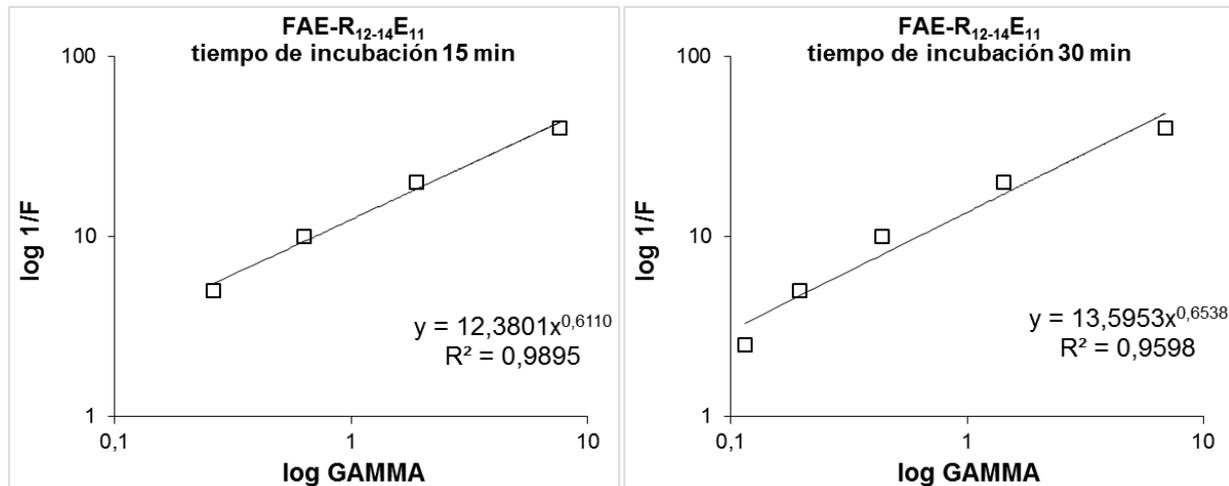


Figura 6.56. Gráficas de concentración – función Gamma para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

De la figura 6.56 se obtiene el valor de EC₅₀ del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar, equivalente a una concentración de 12,38 mg/L.

El factor de dilución equivalente al que produciría una inhibición del 50% teniendo en cuenta una concentración de muestra de 80 mg/L similar a la usada en los ensayos de ozonización sería de 6,462.

A continuación, en la figura 6.57, se muestran las distintas linealizaciones de la inversa del factor de dilución aplicado a la muestra y la función Gamma obtenidas para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ a distintos tiempo de ozonización y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

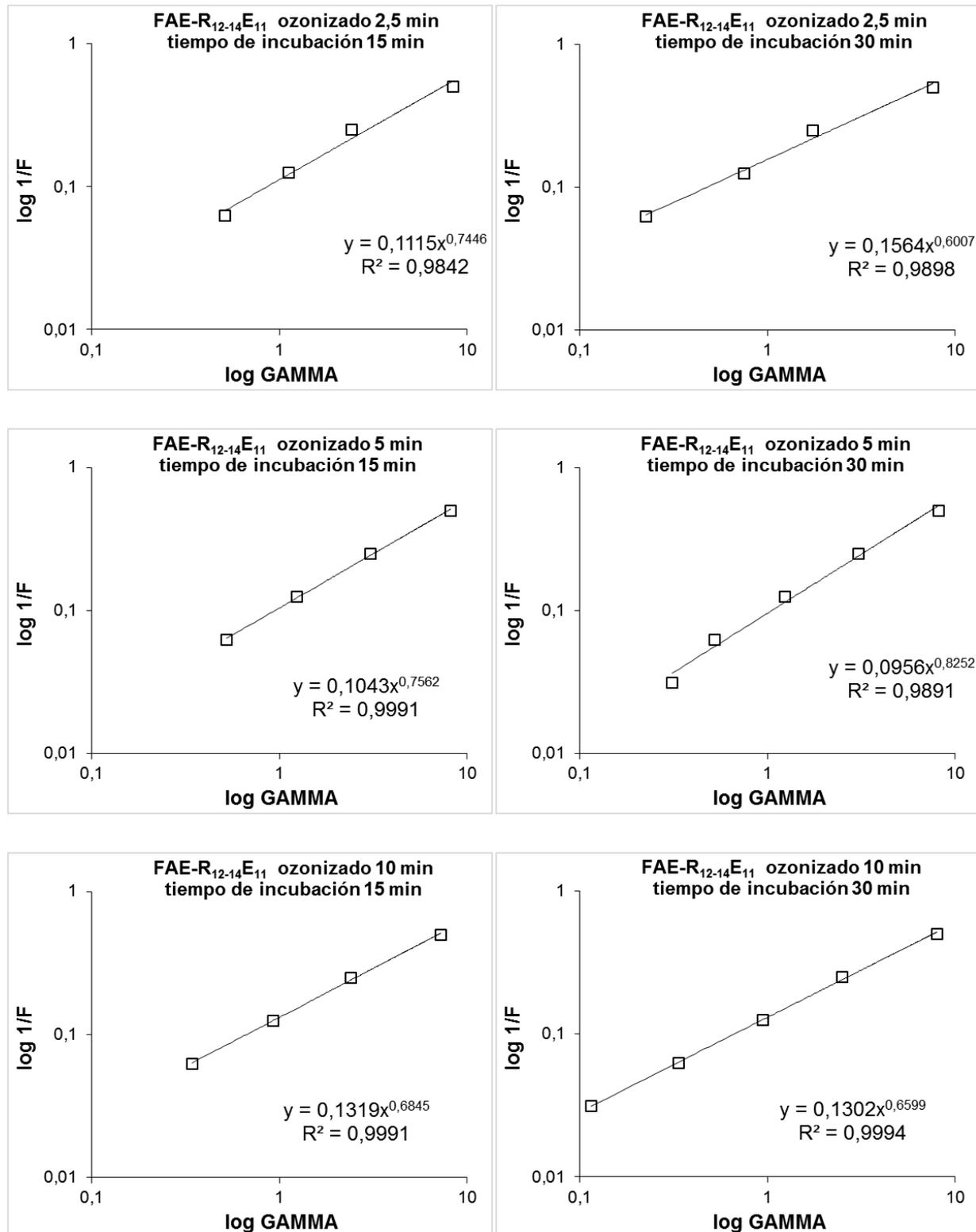


Figura 6.57. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

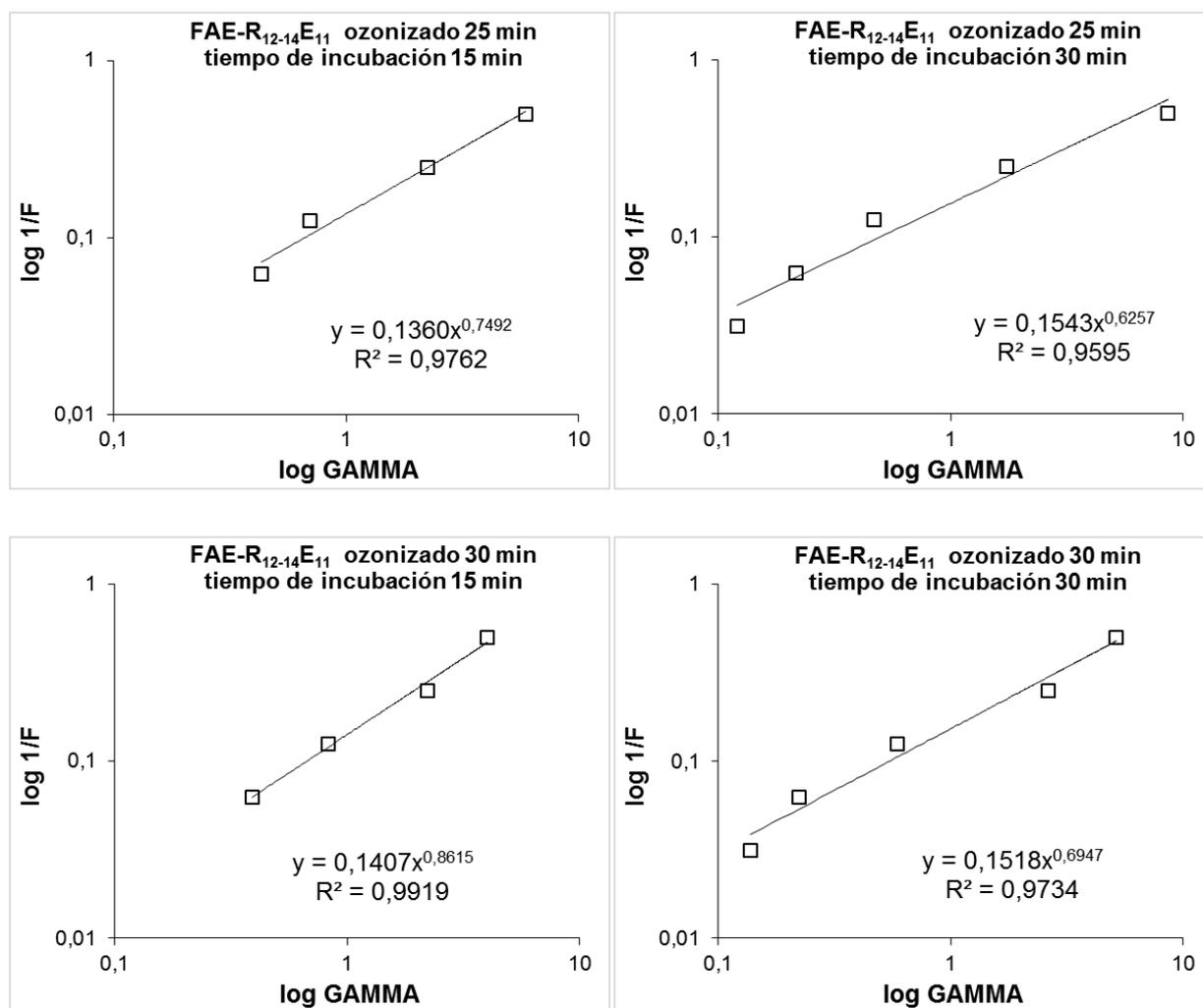


Figura 6.57. (Continuación) Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

En la tabla 6.17 se muestra la evolución de la EC₅₀ para un tiempo de incubación de 15 minutos a diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.17. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tiempo de ozonizado, min	EC ₅₀ , mg/L
0	12,38
2,5	8,92
5	8,34
10	10,55
25	10,88
30	11,25

Para este tensioactivo se encontró un incremento inicial de la toxicidad, similar a los encontrados por Ledakowicz, 2004; sobre tensioactivos no iónicos con grupos etoxilados.

Sin embargo en el presente trabajo, se ha encontrado que dicho incremento de la toxicidad, presenta un máximo (figura 6.58) tras el cual, una seguida exposición al ozono reduce la toxicidad.

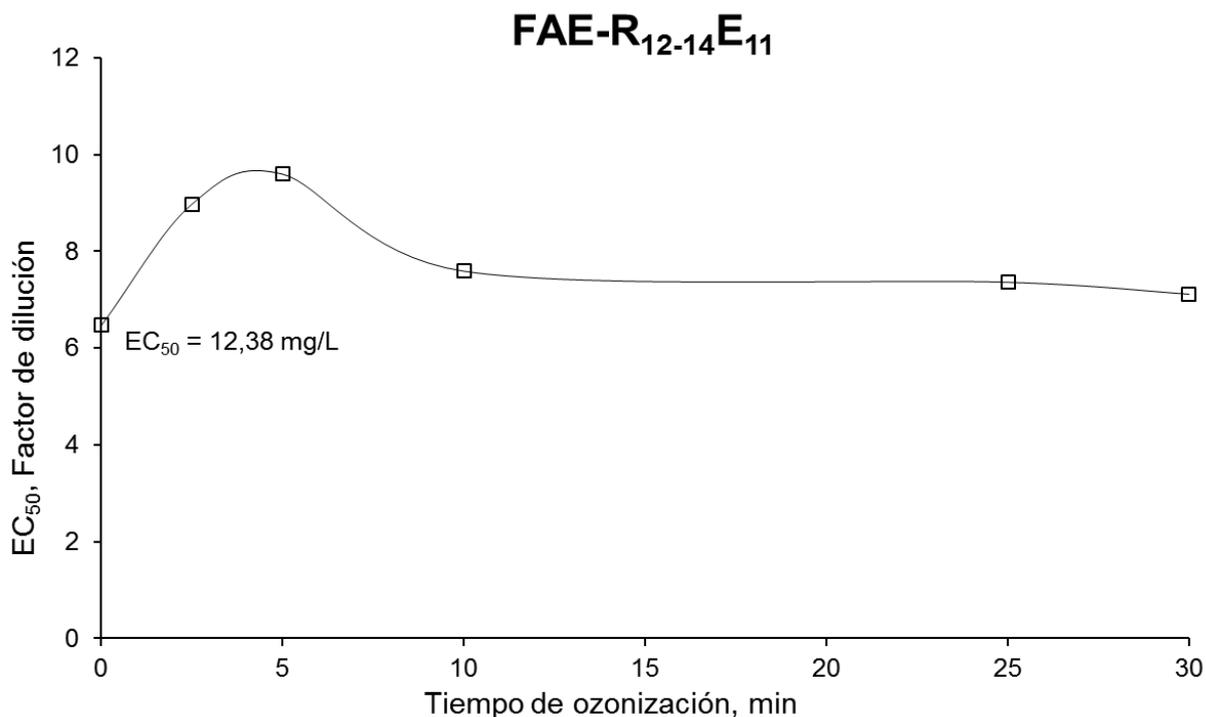


Figura 6.58. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

En la figura 6.58 se observa como en torno a los 4 minutos aparece el valor máximo de toxicidad, volviéndose la muestra en torno a un 10% más tóxica.

Esto vuelve a estar relacionado con la existencia de productos intermedios en la degradación del tensioactivo, más tóxicos que el tensioactivo de partida.

Según lo estudiado por Ledakowicz, 2005; lo más probable es que los grupos éter sufran una degradación hacia diversos compuestos polietoxilados (como el nonilfenol polietoxilado de alta toxicidad) de cadena corta y varios tipos de ácidos, de mayor actividad superficial. La disminución inicial en la tensión superficial implica, según lo predicho por Hisano, 2010; un aumento de la toxicidad.

6.5.1.4. $EC-R_{12-14}E_{10}$

En la figura 6.59 se muestran las distintas linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para el $EC-R_{12-14}E_{10}$ a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

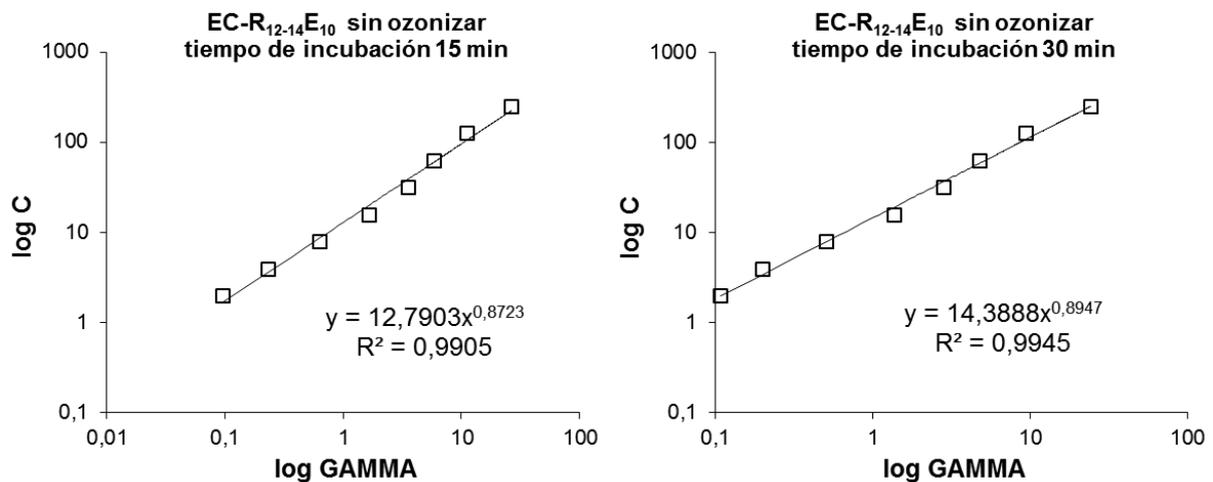


Figura 6.59. Gráficas de concentración – función Gamma para el $EC-R_{12-14}E_{10}$ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

De la figura 6.59 se obtiene el valor de EC_{50} del $EC-R_{12-14}E_{10}$ sin ozonizar, equivalente a una concentración de 12,79 mg/L.

El factor de dilución equivalente al que produciría una inhibición del 50% teniendo en cuenta una concentración de muestra de 80 mg/L similar a la usada en los ensayos de ozonización sería de 6,255.

A continuación, en la figura 6.60, se muestran las distintas linealizaciones de la inversa del factor de dilución aplicado a la muestra y la función Gamma obtenidas para el $EC-R_{12-14}E_{10}$ a distintos tiempo de ozonización y para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

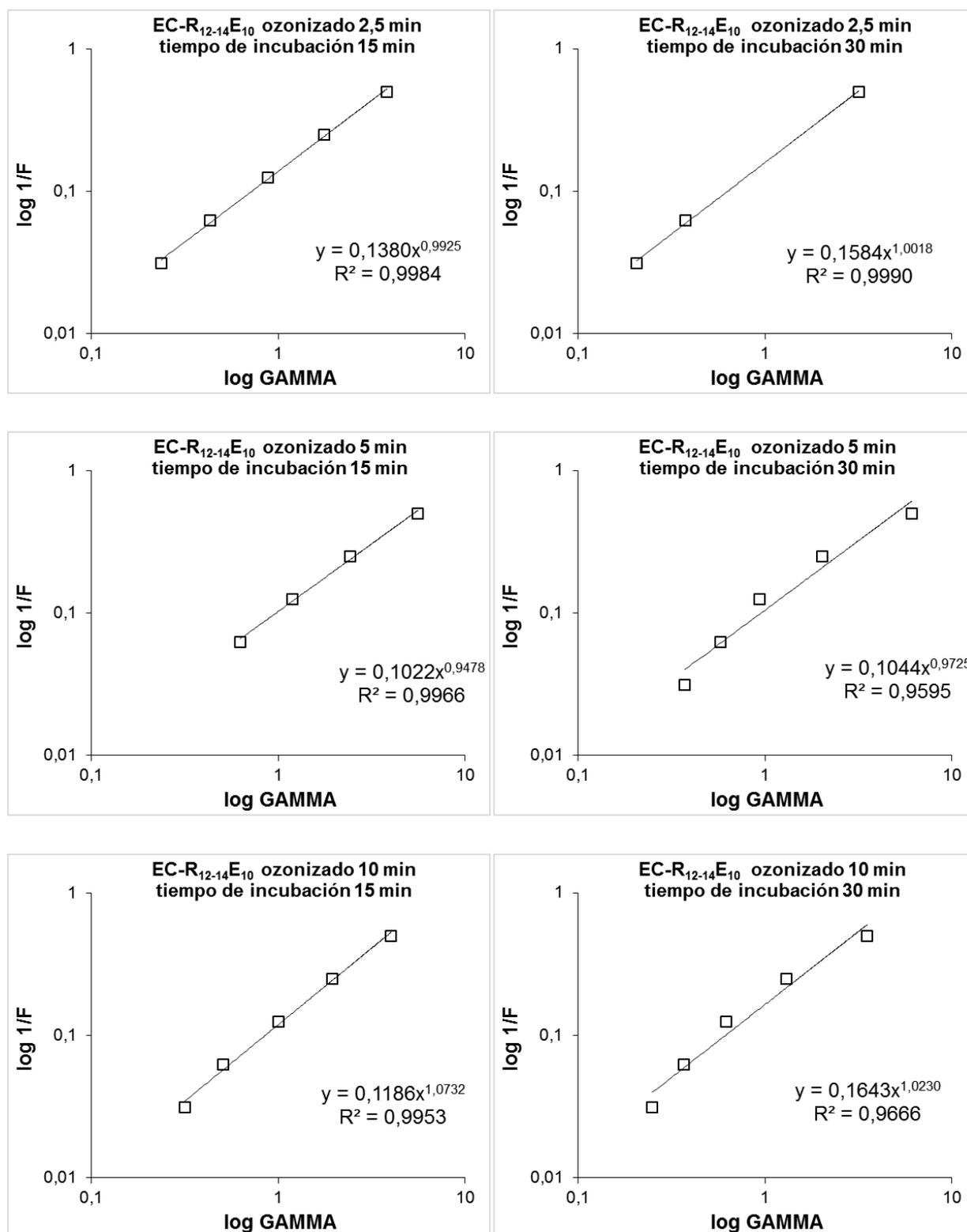


Figura 6.60. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

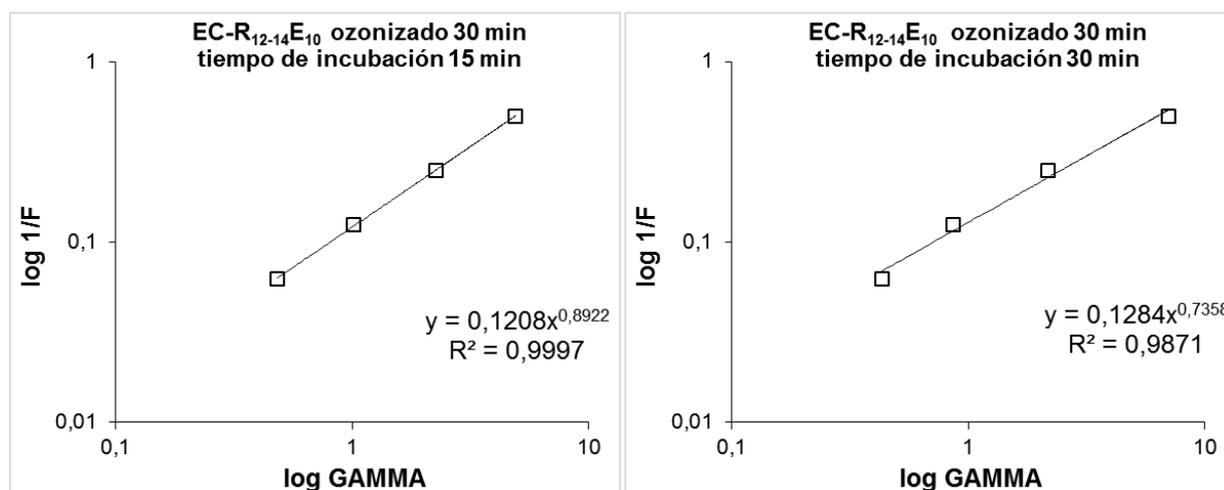


Figura 6.60. (Continuación) Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

En la tabla 6.18 se muestra la evolución de la EC₅₀ para un tiempo de incubación de 15 minutos a diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.18. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tiempo de ozonizado, min	EC ₅₀ , mg/L
0	12,79
2,5	11,04
5	8,18
10	9,49
30	9,66

Para este tensioactivo se encontró un incremento inicial de la toxicidad, similar a los encontrados por Ledakowicz, 2004; sobre tensioactivos no iónicos con grupos etoxilados.

Sin embargo en el presente trabajo, se ha encontrado que dicho incremento de la toxicidad, presenta un máximo (figura 6.61), tras el cual una seguida exposición al ozono reduce la toxicidad.

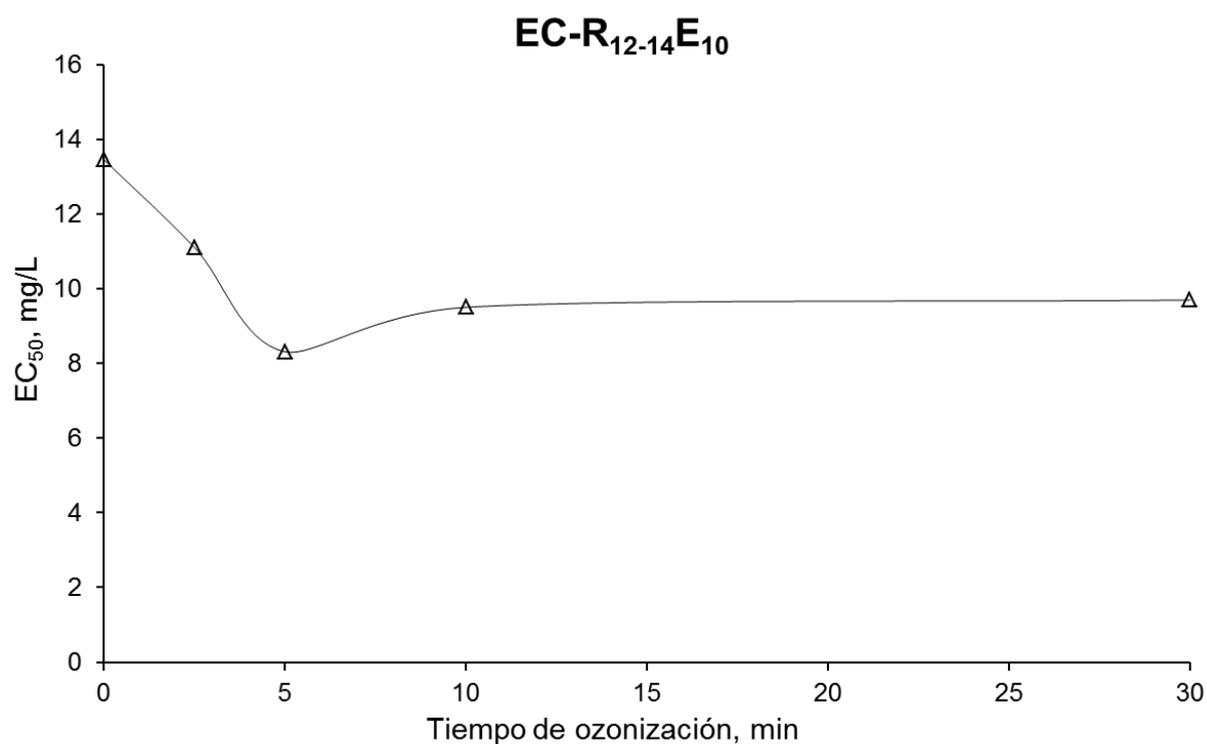


Figura 6.61. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

En la figura 6.61 se observa como en torno a los 5 minutos aparece el valor máximo de toxicidad, volviéndose la muestra en torno a un 40% más tóxica.

Esto vuelve a estar relacionado con la existencia de productos intermedios en la degradación del tensioactivo, más tóxicos que el tensioactivo de partida. Encontrándose que la descomposición de dichos productos intermedios por ozono resulta en otros compuestos menos tóxicos.

6.5.1.5. Conclusiones

La toxicidad de los distintos tensioactivos ensayados no siempre disminuye como cabría esperar tras ser degradado el tensioactivo por el ozono. Algunos de los productos intermedios de la ozonización resultan más tóxicos que el tensioactivo de partida, tal y como predijo también Ledakowicz, 2005.

El APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ha resultado ser el único que presenta una disminución progresiva de su toxicidad salvo un leve incremento de la toxicidad en torno a los 15 minutos. Del mismo modo se encontró que el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}, probablemente por esa disminución progresiva de la toxicidad, ha resultado ser más biodegradable tras ser ozonizado (apartado 6.4).

Aunque su cinética de degradación (apartado 6.3.4) ha resultado ser más lenta que la del resto de tensioactivos ensayados y presenta una menor degradación del tensioactivo de partida, ha llegado a disminuir su toxicidad haciéndose a los 30 minutos en torno a un 350% menos tóxico respecto a la muestra sin ozonizar, en comparación con el LAS-R₁₁₋₁₄ (30% menos tóxico), el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ (10% más tóxico) y el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ (40% más tóxico) como puede verse en la figura 6.62

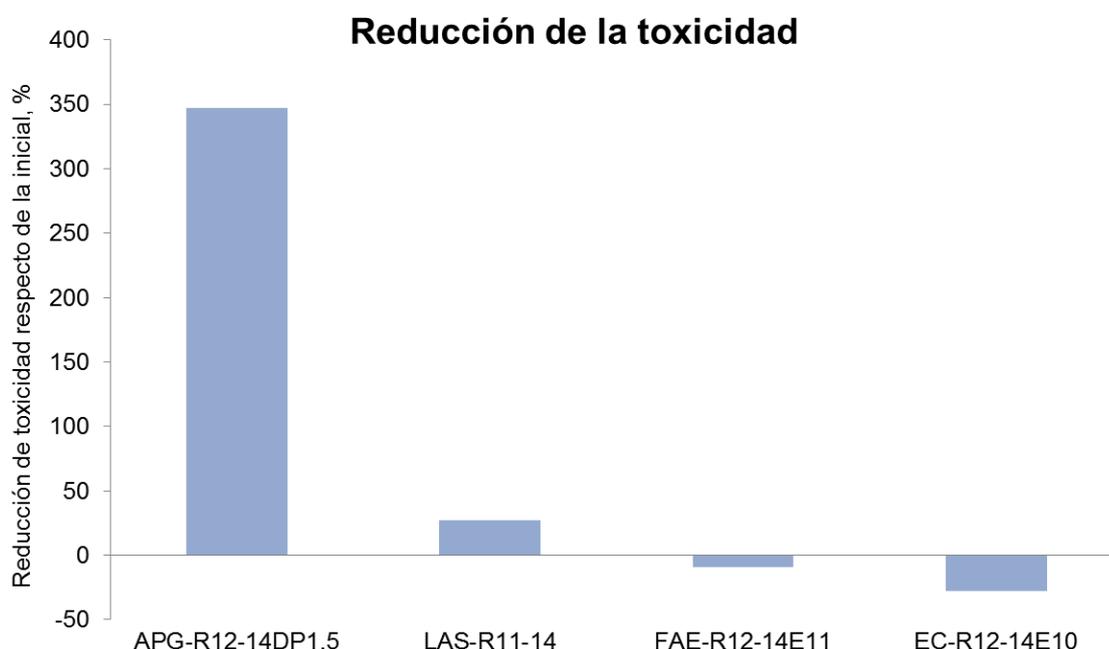


Figura 6.62. Porcentaje de reducción de la toxicidad tras 30 minutos de ozonización para los tensioactivos ensayados.

De la figura 6.62 se pone de manifiesto que los tensioactivos con grupos aromáticos como el LAS-R₁₁₋₁₄ o grupos glucosídicos como el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}; en general, tensioactivos

con grupos de anillo presentan una disminución de la toxicidad. Mientras que por otro lado los grupos éter, presentes en el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ y el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀; y derivados de ácidos carboxílicos, presentes en el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀; conducen a un incremento de la toxicidad.

Esto nos lleva a la conclusión de que los productos de la ozonización a 30 minutos de grupos anillo presentan una toxicidad inferior a la que presenta el tensioactivo de partida y que los productos de la ozonización a 30 minutos de grupos éter y derivados de ácidos carboxílicos presentan una toxicidad mayor.

Puede establecerse por tanto una serie de variación de la toxicidad en función de los grupos presentes en el tensioactivo (figura 6.63)

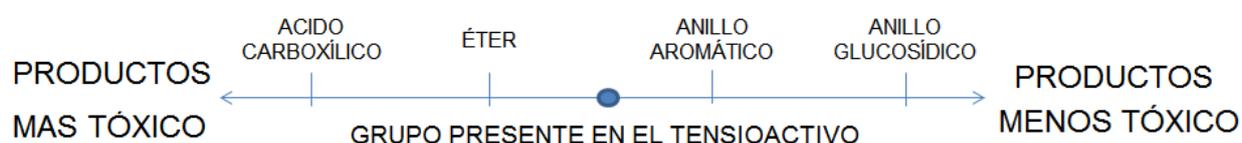


Figura 6.63. Serie de evolución final de la toxicidad en procesos de ozonización en función del grupo presente en el tensioactivo.

El porqué, la presencia de un grupo induce un aumento o una disminución de la toxicidad, estará justificada por los diversos productos producidos durante la ozonización.

En tensioactivos con grupos éter lo más probable es que se formen compuestos polietoxilados de cadena corta y ácidos, posibles responsables de la disminución de la tensión superficial y responsables seguros del aumento de la toxicidad; análogos a los encontrados, en tensioactivos de estructura similar, por Ledakowicz, 2005.

Por otro lado Hisano, 2010; relaciona la influencia de la tensión superficial como indicador de la toxicidad de un tensioactivo, por lo que teniendo en cuenta lo propuesto por Ledakowicz, 2005 e Hisano, 2010; y observando la figura 6.64, puede verse como existe una clara relación entre la toxicidad y tensión superficial.

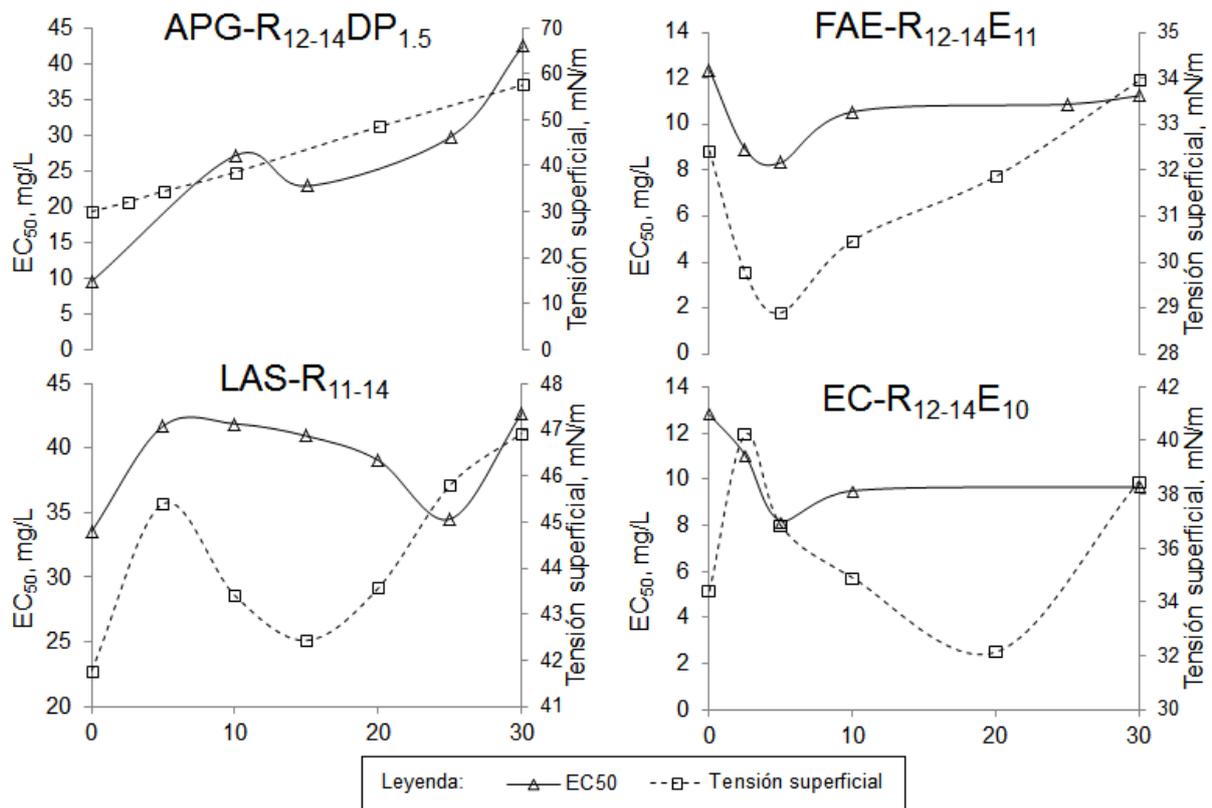


Figura 6.64. Evolución de la tensión superficial y la EC₅₀ en función del tiempo de ozonizado para los distintos tensioactivos ensayados.

Podemos concluir por tanto que la formación de productos intermedios con mayor actividad superficial (menor tensión superficial) induce por tanto un aumento de la toxicidad (disminución del valor de EC₅₀).

6.4.2. Inhibición del crecimiento sobre bacterias *Pseudomona putida*

Puesto que el método de determinación de la inhibición del crecimiento sobre este tipo de bacterias está basado en la medida de la turbidez de la muestra, se encontró el problema de que los tensioactivos no iónicos APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ presentaban una variación en su turbidez con el paso del tiempo, por lo que resultó imposible la determinación del grado de inhibición de sobre el crecimiento de la muestra.

A título de ejemplo se muestra en la figura 6.65 los resultados del ensayo de inhibición realizados para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

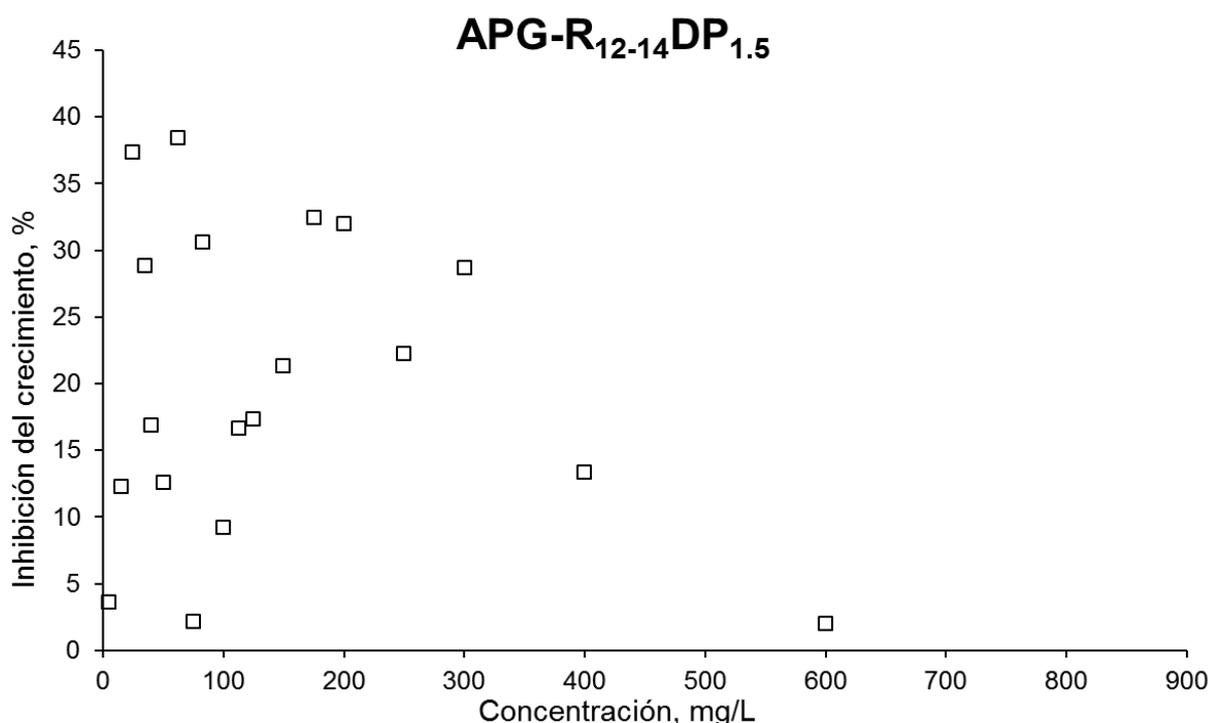


Figura 6.65. Inhibición del crecimiento de *P.putida* a diferentes concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Como puede observarse el % de inhibición del crecimiento calculado varía de manera desordenada sin guardar una relación con la concentración presente. La turbidez de la muestra se ve afectada de varios factores

1. La turbidez que aparece en las disoluciones de tensioactivo con el paso del tiempo
2. La turbidez que produce el crecimiento de *Pseudomonas putida*.

Se pudo establecer la relación entre la variación de la turbidez tras 16h en función de la concentración, sin embargo, la acción de las bacterias modificaba dicha concentración por lo que se acabó por descartar los métodos basados en la turbidez para determinar la inhibición del crecimiento sobre estos tensioactivos.

6.4.2.1. LAS-R₁₁₋₁₄

Observando los resultados obtenidos para los ensayos de inhibición del crecimiento con *P.putida* recogidos en el apartado 5.6, y puesto que a valores bajos de concentración no hay inhibición apreciable y a valores muy altos la inhibición es prácticamente del 100%, se propone un modelo de ajuste sigmoideal, en particular la función sigmoideal de Boltzman (ecuación 6.19), en el que se reproducen todos estos fenómenos.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2 \quad [6.19]$$

En la figura 6.66 puede verse el sentido grafico de la ecuación 6.19

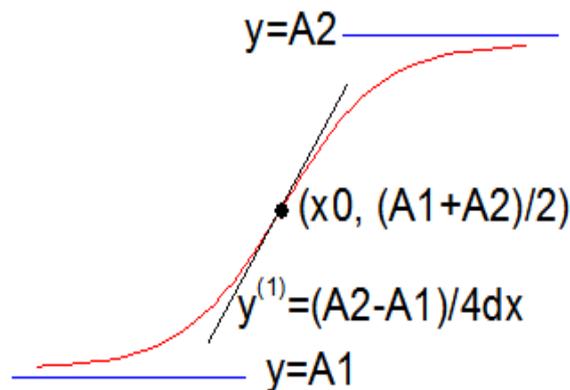


Figura 6.66. Significado grafico de la ecuación sigmoideal de Boltzman

Donde:

- $A_1 = 0\%$
- $A_2 = 100\%$
- x_0 se corresponde con un 50% de inhibición (EC_{50})
- dx es la pendiente de la parte correspondiente a la línea recta

Para el ensayo de inhibición del tensioactivo sin ozonizar se obtuvieron los datos representados en la figura 6.67, donde queda recogido también el valor de EC_{50} igual a 48,60 mg/L.

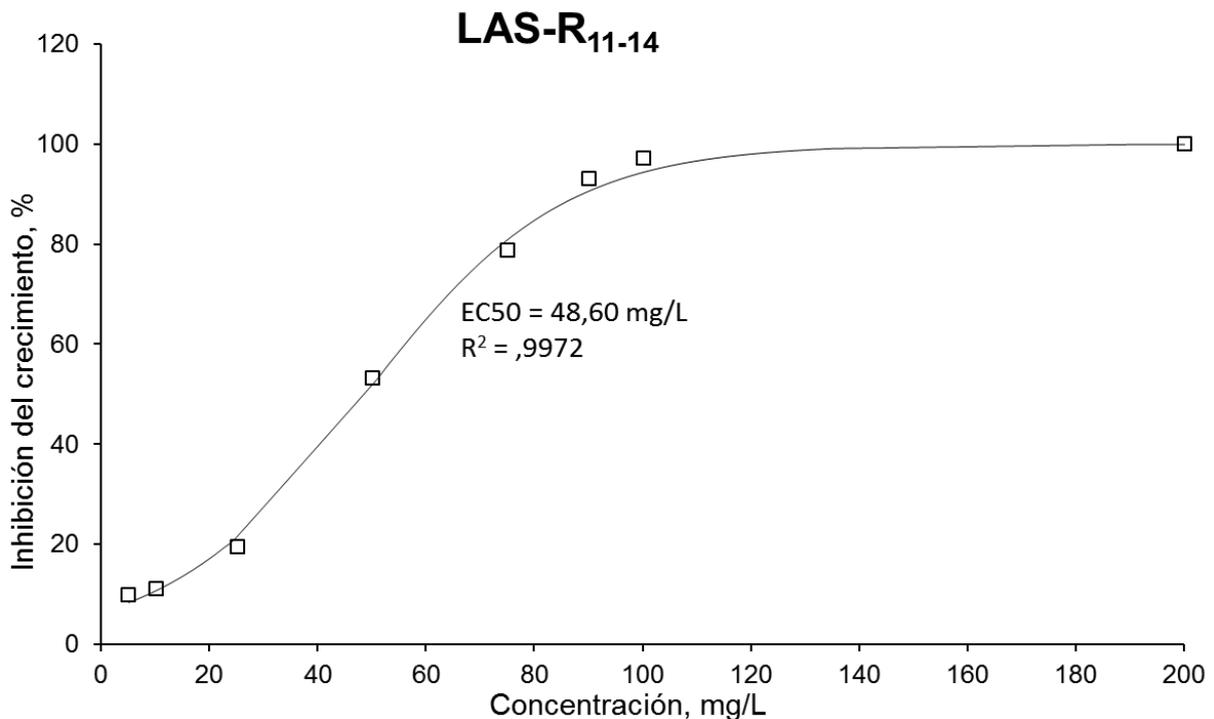


Figura 6.67. Porcentaje de inhibición para el ensayo de inhibición del crecimiento con *Pseudomonas putida* para el LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar.

6.4.2.2. LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado

Respecto al ensayo realizado de inhibición del crecimiento de LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado, se expuso una muestra de 250mg/L a una corriente de ozono de 5Ln/h con un 75% de ozono y un 25% de oxígeno durante 15 minutos y a una temperatura de 25°C.

Tras la ozonización de la muestra de tensioactivo se procedió a realizar el ensayo de inhibición según el procedimiento descrito en el apartado 4.4.2 procediendo a realizar las correspondientes diluciones a partir de la muestra ozonizada.

En la figura 6.68 puede verse la representación de los resultados obtenidos y el valor de EC_{50} calculado (107,63 mg/L).

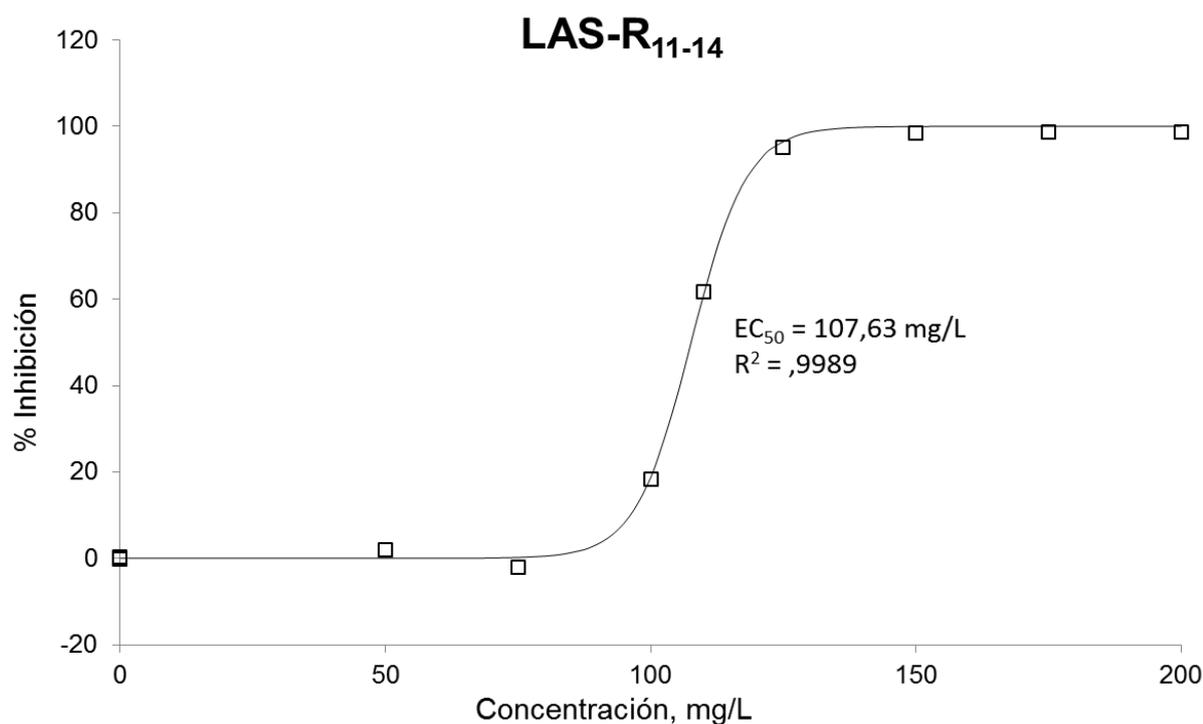


Figura 6.68. Porcentaje de inhibición para el ensayo de inhibición del crecimiento con *Pseudomonas putida* para el LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado.

6.4.2.3. Conclusiones

Como puede verse en la tabla 6.19 el ensayo con *P.putida* corrobora que la ozonización del tensioactivo LAS-R₁₁₋₁₄ conduce a una disminución de la toxicidad, volviéndose en torno a un 120% menos tóxico (30% menos tóxico con *V.fischeri*).

Tabla 6.19. Valores de EC₅₀ para el LAS-R₁₁₋₁₄ antes y después de ozonizar

Tiempo de ozonizado, min	EC ₅₀ , mg/L
0	48,60
15	107,63

6.5. Influencia de la tensión superficial sobre la toxicidad de tensioactivos

Diversos autores (Hisano, 2010, Oya 2008,2010) han reportado estudios sobre la influencia de la tensión superficial sobre la toxicidad, estableciendo la existencia de un rango de valores de tensión superficial sobre los que distintos tensioactivos, en distintas condiciones, presenta los valores de EC_{50} para distintos tipos de ensayos de inhibición.

6.5.1. Tensión superficial frente a concentración de los tensioactivos ensayados

La figura 6.69 muestra las curvas de tensión – concentración de tensioactivo, obtenidas según lo descrito en el apartado 4.6; así como los valores de EC_{50} obtenidos para *V.fischeri* a 15 minutos de incubación de los tensioactivos sin ozonizar.

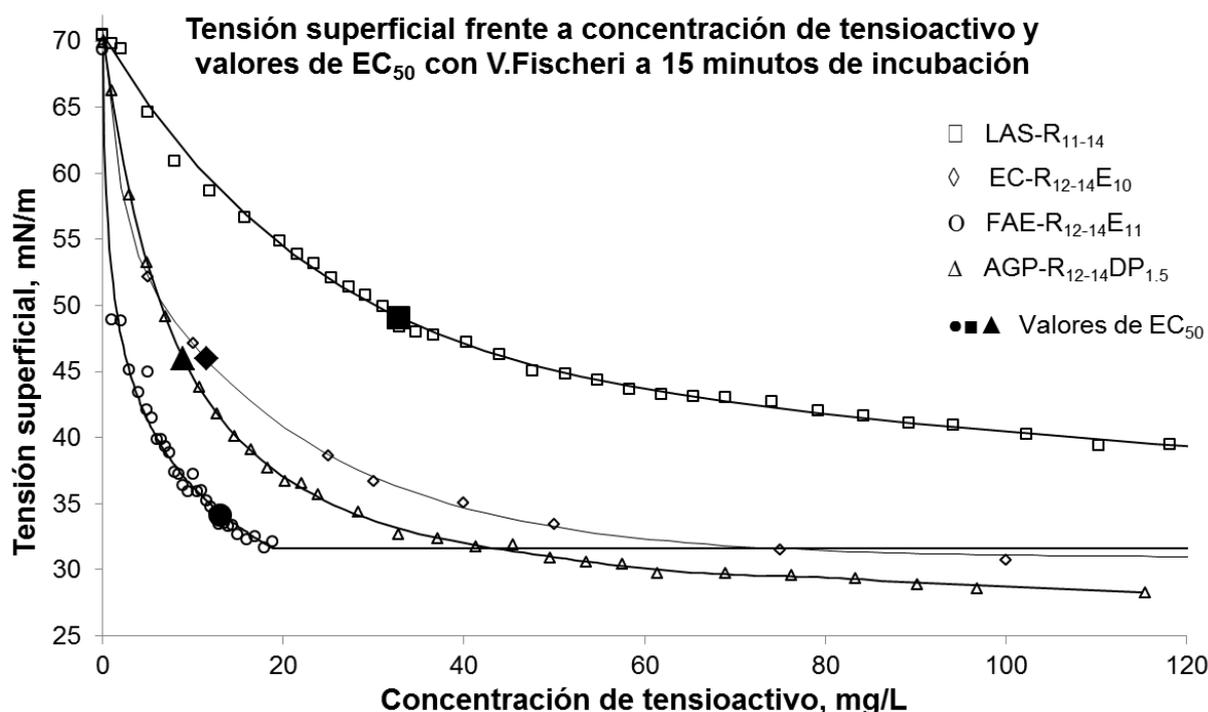


Figura 6.69. Tensión superficial – concentración de tensioactivo y valores de EC_{50} para *V.fischeri* a 15 minutos de incubación

Como puede verse el valor de EC_{50} se presenta en los tensioactivos ensayados por debajo de una tensión superficial de 50 mN/m.

6.5.2. Conclusiones

Cabe destacar que los valores de EC_{50} se sitúan por debajo de una tensión superficial en torno a 50 mN/m. Esto confirma lo predicho por Hisano, 2010; indicando que la tensión superficial parece ser un buen indicador de la toxicidad de un tensioactivo. A menor tensión superficial se espera un mayor índice de toxicidad, pues se conoce (Hisano, 2010) que un

descenso de la tensión superficial aumenta la permeabilidad celular de las distintas especies acuáticas como contramedida al descenso de tensión superficial, provocando la muerte de dichas células.

A igual tensión superficial los tensioactivos no iónicos son menos tóxicos que los aniónicos.

7. LISTADO DE TABLAS

7. LISTADO DE TABLAS

7.1. Introducción

Tabla 3.1. Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria.

Tabla 3.2. Composición de algunos detergentes

Tabla 3.3. Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total.

Tabla 3.4. Valores de IC₅₀ (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a *Daphnia magna*.

Tabla 3.5. Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC₅₀) y frente a *Daphnia magna* (IC₅₀) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados.

Tabla 3.6. Mecanismos de reacción en la ozonización: etapas de reacción y constantes cinéticas

7.2. Materiales y métodos

Tabla 4.1. Propiedades del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizado.

Tabla 4.2. Propiedades del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizado.

Tabla 4.3. Propiedades del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizado.

Tabla 4.4. Especificaciones Técnicas TOC-V CSH

7.3. Resultados experimentales

Tabla 5.1 Valores de absorbancia a distintas concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizando el método de la antrona.

Tabla 5.2 Valores de absorbancia a distintas concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ utilizando el método del Azul de Metileno.

Tabla 5.3 Valores de absorbancia a distintas concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizando el método del Yodo/Yoduro.

Tabla 5.4. Valores de absorbancia a distintas concentraciones de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizando el método del Azul de Metileno.

Tabla 5.5. Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} medidas a 25°C

Tabla 5.6. Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

Tabla 5.7. Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ medidas a 25°C

Tabla 5.8. Datos de Tensión superficial a diferentes concentraciones de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ medidas a 25°C

Tabla 5.9. Datos de Conductividad a diferentes concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ medidas a 25°C

Tabla 5.10. Concentraciones residuales de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} para el ensayo de ozonización.

Tabla 5.11. TOC residual para el ensayo de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.12. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.13. Concentraciones residuales de LAS-R₁₁₋₁₄ para el ensayo de ozonización

Tabla 5.14. TOC residual para el ensayo de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 5.15. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 5.16. Concentraciones residuales de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ para el ensayo de ozonización.

Tabla 5.17. TOC residual para el ensayo de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 5.18. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 5.19. Concentraciones residuales de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ para el ensayo de ozonización.

Tabla 5.20. TOC residual para el ensayo de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Tabla 5.21. Evolución de la tensión superficial para el ensayo de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Tabla 5.22. Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 5.23. Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el LAS-R₁₁₋₁₄

- Tabla 5.24.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar.
- Tabla 5.25.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar.
- Tabla 5.26.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.27.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.28.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos.
- Tabla 5.29.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 15 minutos.
- Tabla 5.30.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.31.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.32.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.33.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.34.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar.
- Tabla 5.35.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar.
- Tabla 5.36.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 5 minutos.
- Tabla 5.37.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 5 minutos.

- Tabla 5.38.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.39.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.40.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 15 minutos.
- Tabla 5.41.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 15 minutos.
- Tabla 5.42.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 20 minutos.
- Tabla 5.43.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 20 minutos.
- Tabla 5.44.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.45.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.46.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.47.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.48.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar.
- Tabla 5.49.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar.
- Tabla 5.50.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 2,5 minutos.
- Tabla 5.51.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 2,5 minutos.

- Tabla 5.52.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 5 minutos.
- Tabla 5.53.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 5 minutos.
- Tabla 5.54.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.55.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 10 minutos.
- Tabla 5.56.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.57.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 25 minutos.
- Tabla 5.58.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.59.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado 30 minutos.
- Tabla 5.60.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar.
- Tabla 5.61.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar.
- Tabla 5.62.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 2,5 minutos.
- Tabla 5.63.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 2,5 minutos.
- Tabla 5.64.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 5 minutos.
- Tabla 5.65.** Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 5 minutos.

Tabla 5.66. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 10 minutos.

Tabla 5.67. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 10 minutos.

Tabla 5.68. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 15 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 30 minutos.

Tabla 5.69. Ensayo de inhibición del crecimiento de *V.fischeri* a 30 minutos de incubación con EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado 30 minutos.

7.4. Discusión de resultados y conclusiones

Tabla 6.1. Parámetros del análisis de regresión para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 6.2. Valores de precisión obtenidos en el rango de valores de 0 a 5 mg/L

Tabla 6.3. Parámetros del análisis de regresión para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 6.4. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 100 mg/L para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 6.5. Parámetros del análisis de regresión para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.6. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 20 mg/L para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.7. Parámetros del análisis de regresión para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Tabla 6.8. Valores de precisión obtenidos en el rango de 0 a 8 mg/L para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Tabla 6.9. CMC's de los tensioactivos ensayados

Tabla 6.10. Parámetros cinéticos de la degradación de los tensioactivos ensayados.

Tabla 6.11. Parámetros cinéticos de la degradación de los tensioactivos ensayados fijando el orden de reacción.

Tabla 6.12. Valores de mineralización a distintos tiempos para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} en el ensayo estático de biodegradación.

Tabla 6.13. Valores de mineralización a distintos tiempo para el LAS-R₁₁₋₁₄ en el ensayo estático de biodegradación.

Tabla 6.14. Parámetros característicos del proceso de biodegradación en el ensayo estático para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} y para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 6.15. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Tabla 6.16. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el LAS-R₁₁₋₁₄

Tabla 6.17. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.18. Evolución de la EC₅₀ a 15 minutos de incubación y diferentes tiempos de ozonización para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Tabla 6.19. Valores de EC₅₀ para el LAS-R₁₁₋₁₄ antes y después de ozonizar

8. LISTADO DE FIGURAS

8. LISTADO DE FIGURAS

8.1. Introducción

Figura 3.1. Consumo mundial de tensioactivos durante el año 2006.

Figura 3.2. Evolución del consumo de detergentes en España durante los años 1993-2010.

Figura 3.3. Evolución del consumo de tensioactivos por tipo en España durante los años 1993-2010

Figura 3.4 Ciclo de los mecanismos de descomposición del ozono en disolución acuosa iniciado por el ion hidroxilo

8.2. Materiales y métodos

Figura 4.1. Esquema de ozonización para los ensayos estáticos de biodegradación

Figura 4.2. Esquema de ozonización general para muestras de tensioactivo.

Figura 4.3.- Recta de calibrado para el LAS según el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno.

Figura 4.4. Diagrama de flujo del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu.

Figura 4.5. Vista interior del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu

Figura 4.6.- Recta de calibrado para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por el método de la Antrona.

Figura 4.7. Recta de calibrado para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ por el método colorimétrico del yodo-yoduro

Figura 4.8. Relación lineal entre la función G y la concentración para el tensioactivo APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 4.9. Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación

Figura 4.10. Esquema del método del plato para la medida de la tensión superficial

Figura 4.11. Fotografía del tensiómetro KRÜSS TENSIOMETER K11.

Figura 4.12. Representación de la conductividad frente a la concentración para el LAS-R₁₁₋₁₄

8.3. Discusión de resultados y conclusiones

Figura 6.1. Procedimiento analítico simplificado para la determinación de tensioactivos aniónicos.

Figura 6.2. Recta de calibrado obtenida para el LAS-R₁₁₋₁₄ utilizando el metodo simplificado de las sustancias activas al azul de metileno

Figura 6.3. Grafico de residuales la recta de calibración del LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.4. Procedimiento analítico simplificado para la determinación de APG's

Figura 6.5. Recta de calibrado obtenida para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} utilizando el metodo de la antrona.

Figura 6.6. Grafico de residuales la recta de calibración del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.7. Procedimiento analítico para la determinación de tensioactivos no iónicos por el método del yodo/yoduro.

Figura 6.8. Recta de calibrado obtenida para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ utilizando el método del yodo/yoduro

Figura 6.9. Grafico de residuales la recta de calibración del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.10. Procedimiento analítico para la determinación del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ por el método del MBAS.

Figura 6.11. Recta de calibrado obtenida para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ utilizando el método del MBAS

Figura 6.12. Grafico de residuales la recta de calibración del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Figura 6.13. Tensión superficial frente a concentración del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} a 25°C y cálculo de la CMC

Figura 6.14. Tensión superficial frente a concentración del LAS-R₁₁₋₁₄ a 25°C y cálculo de la CMC.

Figura 6.15. Conductividad frente a concentración del LAS-R₁₁₋₁₄ a 25°C y cálculo de la CMC.

Figura 6.16. Tensión superficial frente a concentración del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ a 25°C y cálculo de la CMC.

Figura 6.17 Tensión superficial frente a concentración del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ a 25°C y cálculo de la CMC.

Figura 6.18. Porcentaje de tensioactivo residual normalizado, ozonizado a 5Ln/h, 25°C y distintos porcentajes de NaCl.

Figura 6.19. Evolución de la concentración de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³, 25°C y con un 2% de NaCl.

Figura 6.20. Evolución media de la concentración de carbono orgánico disuelto de los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.21. Mineralización media de los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.22. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.23. Evolución de la concentración de LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Figura 6.24. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.25 Mineralización en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.26. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.27. Evolución de la concentración de FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Figura 6.28. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.29. Mineralización en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.30. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.31. Evolución de la concentración de EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado a 5Ln/h, 113gO₃/Nm³ y 25°C

Figura 6.32. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto en los ensayos de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Figura 6.33. Mineralización en los ensayos de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Figura 6.34. Evolución de la tensión superficial en los ensayos de ozonización del EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Figura 6.35. Ajuste del modelo cinético propuesto para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.36. Ajuste del modelo cinético propuesto para el LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.37. Ajuste del modelo cinético propuesto para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.38. Ajuste del modelo cinético propuesto para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀

Figura 6.39. Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación

Figura 6.40. Tensioactivo residual en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.41. Biodegradación primaria en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.42. Concentración residual de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} en el ensayo estático para concentraciones por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.43. %Tensioactivo residual en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.44. %Biodegradación primaria en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.45. Concentración residual de LAS-R₁₁₋₁₄ en el ensayo estático para concentraciones por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.46. %COD residual en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.47. %Biodegradación última en el ensayo estático para concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.48 % COD residual en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.49 %Biodegradación última en el ensayo estático para concentraciones de LAS-R₁₁₋₁₄ por encima y debajo de la CMC, antes y después de ozonizar.

Figura 6.50. Graficas de concentración – función Gamma para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.51. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5} ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.52 Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.53. Gráficas de concentración – función Gamma para el LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.54. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.55. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del LAS-R₁₁₋₁₄

Figura 6.56. Gráficas de concentración – función Gamma para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.57. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.58. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.59. Gráficas de concentración – función Gamma para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ sin ozonizar y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.60. Gráficas de inversa del factor de dilución – función Gamma para el EC-R₁₂₋₁₄E₁₀ ozonizado a distintos tiempos y a tiempos de incubación de 15 y 30 minutos.

Figura 6.61. Evolución del factor de dilución correspondiente a la EC₅₀ a 15min con *V.fischeri* en los ensayos de ozonización del FAE-R₁₂₋₁₄E₁₁

Figura 6.62. Porcentaje de reducción de la toxicidad tras 30 minutos de ozonización para los tensioactivos ensayados.

Figura 6.63. Serie de evolución final de la toxicidad en procesos de ozonización en función del grupo presente en el tensioactivo.

Figura 6.64. Evolución de la tensión superficial y la EC₅₀ en función del tiempo de ozonizado para los distintos tensioactivos ensayados.

Figura 6.65. Inhibición del crecimiento de *P.putida* a diferentes concentraciones de APG-R₁₂₋₁₄DP_{1.5}

Figura 6.66. Significado grafico de la ecuación sigmoïdal de Boltzman

Figura 6.67. Porcentaje de inhibición para el ensayo de inhibición del crecimiento con *Pseudomonas putida* para el LAS-R₁₁₋₁₄ sin ozonizar.

Figura 6.68. Porcentaje de inhibición para el ensayo de inhibición del crecimiento con *Pseudomonas putida* para el LAS-R₁₁₋₁₄ ozonizado.

Figura 6.69. Tensión superficial – concentración de tensioactivo y valores de EC₅₀ para *V.fischeri* a 15 minutos de incubación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Allah, A.M.A., T. Srorr, 'Biodegradation of Anionic Surfactants in the Presence of Organic Contaminants. *Water Res.* 1998;32(2):944–947
- Al-Soufi W., Piñeiro L., Novo M. A model for monomer and micellar concentrations in surfactants solutions: Application to conductivity, NMR, diffusion, and surface tensión data. *Journal of Colloid and Interface Sci.* 2012;370:102-110
- Altmajer D. Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de lavado. *Tesis Doctoral* 2004 Departamento de Ingeniería Química. UGR
- Bailón R. Ingeniería del conocimiento y vigilancia tecnológica aplicada a la investigación en el campo de los tensioactivos. Desarrollo de un modelo ciencimetrico unificado. *Tesis Doctoral.* 2003 Departamento de Ingeniería Química. UGR
- Balson, T., M.S.B. Felix, The Biodegradability of Non-Ionic Surfactants. Biodegradability of Surfactants. D.R. Karsa and M.R. Porter, (Editors.) (Blackie Academic Professional, 1995) pp. 204–230.
- Beltrán-Heredia J, Torregrosa J, Domínguez JR, Peres JA. Kinetics of the reaction between ozone and phenolic acids present in argo-industrial wastewaters. *Water Res* 2001;35:1077–1085.
- BOE (1985). Orden de 5 de Septiembre de 1985. BOE nº 260 de 30 de Octubre de 1985 y correcciones en BOE nº 311 del 28 de Diciembre de 1985.
- BOE (1986). Ley de Aguas 29/1985. BOE nº 103 de 30 de Abril de 1986.
- BOE (1988). Orden de 11 de Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando son destinadas a la producción de agua potable. BOE nº 124 de 24 de Mayo de 1988.
- BOE (1990). Real Decreto 1138/90 de 14 de Septiembre de 1990 por el que se aprueba la Reglamentación técnico sanitaria para abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables. BOE nº 226 del 20 de Septiembre de 1990.
- BOE (1995). Real Decreto 363/1995 de 10 de marzo por el que se aprueba el Reglamento

- sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. BOE nº 133 de 05 de Junio de 1995.
- BOE (1999). Real Decreto 770/1999 de 7 de Mayo por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes limpiadores. BOE Nº 118 de 18 de Mayo de 1999.
- BOJA (1996). Decreto de 16 de Enero por el que se aprueba el reglamento de la calidad para las aguas litorales. BOJA nº 19 de 8 de Febrero de 1996.
- BOJA (1997). Orden de 14 de Febrero de 1997 por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos. BOJA nº 27 de 1997 de 4 de Marzo de 1997.
- Brambilla A., Bolzacchini E., Orlandi M., Polesello S., Rindone B. Reactivity of two models of non-ionic surfactants with ozone *Wat.Res* 1997;31(8):1839-1846
- Brambilla A., Calvosa L., Monteverdi A., Polesello S., Rindone B. Ozono oxidation of polyethoxylated alcohols. *Wat. Res.* 1993;27(8):1313-1322
- Buhler RE, Staehelin J, Hoigne J. Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 1. HO₂/O₂ and HO₃/O₃ as intermediates. *J Phys Chem* 1984;88:2560–2564.
- Calvosa L., Monteverdi A., Rindone B., Riva G. Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation. *Wat. Res.* 1991;25(8):985-993
- CEE (1973a). Directiva 73/404/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materias de detergentes (DO L 347 de 17/12/1973).
- CEE (1973b). Directiva 73/405/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos (DO L 109 de 17/12/1973).
- CEE (1982a). Directiva 82/243/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los

- estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/18 de 1982.
- CEE (1982b). Directiva 82/242/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/1 de 1982.
- CEE (1986). Directiva 86/94/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos (DO L 80 de 25/3/1986).
- Crabb N., Persinger H. The determination of poly(oxyethylene) nonionic surfactants in water at the parts per million level. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 1964;41:752-755
- Crabb, N. y Persinger, H. The determination of poly(oxyethylene) nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1964;41: 752-755.
- Cshersháti T., Forgács E., OROS G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ. Int.* 2002;28: 337-348.
- Cho M., Fortner J., Hughes J., Kim J. Escherichia coli inactivation by water-soluble, ozonated C60 derivative: Kinetics and mechanism. *Environ. Sci. Technol.* 2009;43:7410-7415
- Chu W., Chan K., Graham N. Enhancement of ozone oxidation and its associated processes in the presence of surfactant: Degradation of atrazine *Chemosphere* 2006;64:931-936
- Delanghe B., Merkras C, Graham N. Aqueous Ozonation of Surfactants: A Review. *Ozone Sci. Eng.* 1991;13(6):639-673
- Deleu M., Paquot M. From renewable vegetable resources to microorganism: new trends in surfactants. *C.R. Chimie* 2004;7
- Dobarganes M. Estudios sobre la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos. *Tesis Doctoral* 1975 Universidad de Sevilla
- Edser C. Latest market analysis. *Focus on Surfactants* 2006;5:1-2.

- Fuerhacker M., Scharf S., Pichler W., Ertl T., Haberl R. Sources and Behavior of Bismuth Active Substances (BiAS) in a Municipal Sewage Treatment Plant. *Science of the Total Environment* 2001;277:95–100.
- García, M., Ribosa, I., Campos, E., Sánchez-Leal, J. "Ecological properties of alkylglucosides.", *Chemosphere* (1997) 35(3): 545-556.
- Gieldowska-Bulska A., Perkowski J., Kos L. The application of ozone in the decomposition of aqueous solutions of nonionic surfactants. *Ozone: Sci & Eng* 2004;26:217-225
- Glace W. Reaction products of ozone: A review *Env. Health perspectives* 1986;69:151-157
- Hisano N., Oya M. Effects of surface activity on aquatic toxicity of binary surfactant mixtures. *J. Oleo Sci.* 2010;59(1):589-599
- INE. Instituto Nacional de Estadística.
- Jurado E., Fernández-Serrano M., Lechuga M., Ríos F., Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants *J. Surfact. Deterg.* 2012;10(1):1-7
- Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Luzón G., Lechuga M. Acute toxicity and relationship between metabolites and ecotoxicity during the biodegradation process of non-ionic surfactants: fatty-alcohol ethoxylates, nonylphenol polyethoxylate and alkylpolyglucosides. *Water Sci. Technol.* 2009;59(12): 2351-2358.
- Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Luzón G., Lechuga M. Comparison and use of methods for the determination of non-ionic surfactants in biodegradation processes. *Tenside Surfactants Detergentes* 2002;39(5):154-159
- Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Luzón G., Lechuga M., Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: Applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests. *Chemosphere* 2006;65:278-285

- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters, *J. Surfactants Deterg.* 2007;10:145-153.
- Jurado-Alameda E., García-Román M., Altmajer-Vaz D., Jiménez-Pérez J. Assessment of the use of ozone for cleaning fatty soils in the food industry. *J. of Food Eng.* 2012;110(1):44-52
- Kimerle R., Swisher R. Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Research* 1977;11:31-37
- Larson R., Games L. Biodegradation of LinearAlcohol Ethoxylates in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 1981;15:1488–1493.
- Lechuga, M. (2005). Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Ledakowicz S., Perkowski J., Bulska A., Jamroz J., Sencio B. Ozonation impact on degradation and toxicity of non-ionic surfactants. *Ozone Sci Eng* 2005;27:437–445.
- M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Fernández-Arteaga, A. Burgos, F. Ríos Influence of Ozonation Processes on the Microbial Degradation of Surfactants. *Procedia Engineering* [Comunicación Aceptada a Congreso: *20th International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012 25 – 29 August 2012, Prague, Czech Republic*]
- Matthijs E. y Hennes E. Determination of surfactants in environmental samples. *Tenside, Surfactants Deterg.* 1991;28(1): 22-27.
- Mezzanotte, V., Castiglioni, F., Todeschini, R., Pavan, M. Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants, *Bioresour. Technol.* 2003;87:87-91.
- Narkis N., Ben-David B., Schneider-Rothel M. Non-Ionic Surfactants Interactions with Ozone. *Tenside Surf. Det.* 1987;24(4):200–204

- Narkis N., Ben-David B., Schneider-Rothel M. Ozone-Induced Biodegradability of Non-Ionic Surfactant. *Water. Res.* 1980;14:1225–1232.
- Nielsen A., Borch K., Westh P. Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochim. Biophys Acta, Biomembr. Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000;1497:321-331.
- Niki E., Yamamoto E., Saito T., Nagano K., Yokoi S., Karniya Y. Ozonization of organic compounds. VII. Carboxylic acids, alcohols and carbonyl compounds. *Bull. Chem. Sac. Jpn.* 1983;6:223-228
- Ning B., Graham N., Zhang Y. Degradation of octylphenol and nonylphenol by ozone – Part II: Indirect reaction. *Chemosphere* 2007;68:1173-1179
- OECD (1971). Pollution by Detergents: Determination of the Biodegradability of Anionic Synthetic Surface Active Agents, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1976). Environment Directorate. Proposed Method for the Determination of the Biodegradability of Surfactants used in a Synthetic Detergents, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1981). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Sección 3: Degradation and Acumulation, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1984a). OECD Guideline for Testing of Chemicals, 202. Daphnia sp reproduction test. OECD. Paris. Francia
- OECD (1984b). OECD Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, growth inhibition test. OECD. Paris. Francia
- OECD (1993a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Section 3: Degradation and Acumulation, OECD. Paris. Francia.
- OECD (1993b). OECD Guideline for Testing of Chemicals, “Ready Biodegradability”, OECD. Paris. Francia.

- Oya M., Hisano N. Decreases in surface activities and aquatic toxicities of linear alkylbenzene sulfonate and alcohol ethoxylates during biodegradation. *J. Oleo Sci.* 2010;59(1):31-39
- Oya M., Yuka T., Ishikawa Y. Large decrease in acute toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in hard water and seawater by adding adsorbent. *J. Oleo Sci.* 2008;57(1):15-21
- Pelizzetti E., Minero C., Maurino V., Hidaka H., Serpone N. Photocatalytic Process for Surfactant Degradation. *Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air* (New York:Elsevier Sci. Pub. 1993;261–273.
- Perkowski J., Radzymin´ski J., Ledakowicz S. Ozonation of Aqueous Solutions of Triton X-100. *Proc. Int. Ozone Symp. Application of Ozone in Wastewater Treatment.* Warsaw, pp. 382–392.
- Ramírez-Duarte, W.F, Rondón-Barragán, I.S, Eslava-Mocha, P.R. Surfactants associated to herbicides: Effects in aquatic organisms. *Orinoquia* 2002;9:45-59.
- Rand, G. Aquatic Toxicology: Effects, Environmental fate and Risk Assessment. *Gary M. Rand (Ed).* 1995
- Reglamento CE nº 1271 (2008). Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 235, 05.09.2008).
- Reglamento CE nº 1271, (2008). Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas". (DO L 353, 31.12.2008).
- Reglamento CE nº 1336, (2008). Reglamento (CE) nº 1336/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, que modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 para adaptarlo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 354, 31.12.2008).

- Reglamento CE nº 551 (2009). Reglamento (CE) nº 551/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se modifica el Anexo V – Lista de tensioactivos objeto de excepción, y Anexo VI-Lista de tensioactivos de detergentes prohibidos o limitados (DO L 164, 26.6.2009).
- Reglamento CE nº 648, (2004). Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes. (DO L 104, 08.04.2004)
- Reglamento CE nº 907, (2006). Reglamento (CE) nº 907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se modifica el Anexo III: Métodos de ensayo de biodegradabilidad y Anexo VII – Etiquetado y hoja informativa de ingredientes. (DO L 168, 21.6.2006).
- Ribosa, I., García, M.T., Sánchez-Leal, J. y González, J.J. Photobacterium Phosphoreum test data of non-ionic surfactants. *Toxicol. Environ. Chem.* 1993;39(3-4): 273-241.
- Richerich, K. y Steber, J. The time-window- an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. *Chemosphere* 2001;44:1649-1654
- Rivera-Utrilla J., Bautista-Toledo M., Sánchez-Polo M., Méndez Díaz J., Removal of surfactant dodecylbenzene sulfonate by consecutive use of ozonation and biodegradation. *Eng. Life Sci.* 2012;12(1):113-116
- Rivera-Utrilla J., Bautista-Toledo M., Sánchez-Polo M., Méndez Díaz J. Enhanced oxidation of sodium dodecylbenzenesulfonate aqueous solution using ozonation catalyzed by base treated zeolite. *Che. Eng. J.* 2012;180:204-209
- Robledo J. El sector de detergentes en España *Ingeniería Química* 2011;498:104-108
- Salager J., Anton R. Métodos de medición de la tensión superficial o interfacial *Cuaderno FIRP S205-B* 2005. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes.
- Salanitro, J. Diaz L. Anaerobic Biodegradability Testing of Surfactants. *Chemosphere* 1995;30(5):813–830.
- Sánchez-Leal, J. Aspectos ecológicos de los detergentes, (1ª Edición). *GPE: Colección temas medioambientales*. 1995 Gestió i Promoció Editorial, S.A. Barcelona. España.

- Scott M., Jones M. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et biophysica acta* 2000;1505:235-251
- Sibila, M. Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino. 2008 Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Sibila, M., Garrido, M., Perales, J., Quiroga, J. Ecotoxicity and biodegradability of an alkyl ethoxysulphate surfactants in coastal waters. *Sci. Total. Environ* 2008;394:265-74.
- Staehelin J, Buhler RE, Hoigne J. Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 2.OH and HO₂ as chain intermediates. *J Phys Chem* 1984;88:5999–6004.
- Staehelin J, Hoigne J. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environ Sci Technol* 1985;19:1206–1213.
- Struijs, J. y Stoltenkamp, J. Testing surfactants for ultimate biodegradability. *Chemosphere* 28(8): 1994;1503-1523.
- Talmage, S. "Environmental and Human Safety of Major Surfactants" New York: Lewis (1998)
- Umsicht, F.I. Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants. *Oberhausen*. 2003
- UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55-844-91). Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE EN 903 (NORMA UNE EN 903). Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM (ISO 7875-1:1984, modificada) (versión oficial en 903: 1993).
- UNE EN ISO 11348-2 (NORMA UNE EN ISO 11348-2). Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de vibrio fischeri (Ensayo de bacterias luminiscentes).

- Ungar W., Jonas C., Schwammlein K., Leitzke O. Selective Degradation of Surfactants with Ozone. *Regional Conference on Ozone, UV Light, AOP in Water Treatment*, Amsterdam, pp. 29–56.
- Vashon R. Schwab B. Mineralization of Linear Alcohol Ethoxylates and Linear Alcohol Ethoxy Sulfates at Trace Concentrations in Estuarine Water. *Environ. Sci. Technol.* 1982;16:433–436.
- Wagner, S. and B. Schink, “Anaerobic Degradation of Nonionic and Anionic Surfactants in Enrichment Cultures and Fixed-Bed Reactors”, *Water Res.* 21:615–622 (1987).
- Willing, A., Messinger, H., Aulmann, W. Ecology and toxicology of alkyl polyglycosides. *Handbook of Detergents, Part B: Environmental Impact.* 2004; *Marcel Dekker, New York.*
- Yangxin Y., Jin Z., Bayly A. Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Che. Eng.* 2008;16(4):517-527
- Ying, G.G. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int.* 2006;32:417-431.
- Zhang C., Valsaraj K., Constant W., Roy D. Aerobic Biodegradation Kinetics of Four Anionic and Nonionic Surfactants at Sub- and Supra-Critical Micelle Concentrations (CMCs). *Water Res.* 1999;33(1):115–124.
- Zhao W., Shi H., Wang D. Ozonation of Cationic Red X-GRL in aqueous solution: degradation and mechanism. *Chemosphere* 2004;67:1189-1199
- Zhao W., Wu Z., Wang D. Ozone direct oxidation kinetics of Cationic Red X-GRL in aqueous solution. *J. Hazardous Materials* 2006;137:1859-1865
- Zhao W., Liu F., Yang Y., Tan M., Zhao D. Ozonation of Cationic Red X-GRL in aqueous solution: Kinetics and modeling. *J. of Hazardous Materials* 2011;187:526-533