

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO AMBIENTAL  
DEL SULFONATO DE ALQUILBENCENO LINEAL  
(LAS) EN UNA PARCELA AGRÍCOLA  
DE LA VEGA DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL**

**MÁRCIO NIMER LEITE**

**GRANADA, 2007**





**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO AMBIENTAL  
DEL SULFONATO DE ALQUILBENCENO LINEAL  
(LAS) EN UNA PARCELA AGRÍCOLA  
DE LA VEGA DE GRANADA**

por

**MÁRCIO NIMER LEITE**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**VISADA en Granada a 16 de Marzo  
de 2007**

**MEMORIA presentada para aspirar  
al Grado de Doctor por la  
Universidad de Granada**

**Fdo. Márcio Nimer Leite  
Licenciado en Farmacia**

**Fdo. Prof. Dr. José Luís Vilchez Quero  
Catedrático del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad  
de Granada**

**Fdo. Prof. Dr. Guillermo Crovetto Montoya  
Profesor Titular del Departamento  
de Química Física de la Universidad  
de Granada**

**Fdo. Dr. Oscar Ballesteros García  
Investigador “Juan de la Cierva” del  
Departamento de Química Analítica  
de la Universidad de Granada**



*A mis padres, Inés y Odir*

*A Noemí*



---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

---

---





## **Agradecimientos**

---

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis Directores: el Dr. D. José Luis Vílchez Quero, el Dr. D. Guillermo Crovetto Montoya y el Dr. D. Oscar Ballesteros García, por la propuesta del tema de esta Memoria y por el apoyo, la confianza, la dedicación y el interés depositados en mí para llevar a cabo este estudio, así como, por su orientación, interés y valiosos consejos que han permitido la conclusión de la misma.

A los profs. Dr. José Miguel Rodríguez Maroto y Dr. Francisco García-Herruzo (ambos de la Universidad de Málaga) por la realización de la modelización.

A Inocencio por su fundamental ayuda sin la cual parte de este trabajo resultaría ser bastante más difícil o, incluso, imposible.

A PETRESA, por la financiación de la investigación y por el suministro de los patrones adecuados para efectuar los experimentos necesarios.

A mis compañeros de laboratorio del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada: Jalila, Inmaculada, Carolina, Ana, Samuel, Arno, Karim, Abdel Kader, Paco, Lilian, Avismelsi, Younes, Julio, Alejandro, Javier, Francisco, y especialmente a Antonio Garballo por su ayuda trascendental.

A Mar, del Instituto del Agua de la Universidad de Granada, por haberme ayudado en parte de esta Memoria.

A mis amigos: Alicia, Piru, Jorge, José, Leandro, Silvia, entre otros, y a todos los que me han ayudado o incentivado en algún momento de esta trayectoria.

A mis padres, Ines y Odir Antônio, y a mis hermanos Marcelo, Leonardo (*in memoriam*), Carolina, Felipe y Odir Antônio, por el apoyo y confianza sin los cuales nunca hubiera podido llegar a presentar esta Memoria.

A mi familia española, Isaías, Lidia, Isaías, Antonio, María de los Ángeles, Manuela, Juan, Ruth y especialmente a Lucía por el auxilio y por cualquier ayuda que me han podido prestar durante todo el tiempo que llevo aquí en España.

A todas las personas que formaron o que forman parte de mi vida, transmitiendo valores, ideas y ejemplos, y que, indudablemente, contribuyen o contribuyeron para la persona que soy hoy.

Y, finalmente, a Noemí quien ha estado siempre a mi lado, tanto en los buenos como en los malos momentos, aguantándome, alentándome para proseguir adelante y aportándome ilusión y fortaleza, tan importante en los momentos de desánimo.

---

---

## ÍNDICE

---

---



---

<b>OBJETO DE LA TESIS</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1 - DESARROLLO HISTÓRICO, CLASIFICACIÓN Y CONSTITUCIÓN DE SUSTANCIAS CON CARÁCTER TENSOACTIVO.....	9
1.1 - Desarrollo histórico de las sustancias tensioactivas .....	9
1.2 - Clasificación .....	15
1.3 - Capacidad detergente .....	24
1.4 - Constitución de los Detergentes: Tensioactivos y Componentes Complementarios .....	28
2 - SULFONATO DE ALQUILBENCENO LINEAL ( <i>LAS</i> ). SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS .....	29
2.1 - Síntesis .....	29
2.1.1 - Obtención de parafina.....	29
2.1.2 - Síntesis del alquilbenceno lineal ( <i>LAB</i> ) .....	30
2.1.3 - Síntesis del sulfonato de alquilbenceno lineal ( <i>LAS</i> ) .....	31
2.2 - Propiedades físicas y químicas del <i>LAS</i> .....	33
3 - CONSUMO Y APLICACIONES DEL <i>LAS</i> .....	36
4 - COMPORTAMIENTO MEDIOAMBIENTAL .....	39
4.1 - Actividad biológica del <i>LAS</i> .....	44
4.1.1 - Actividad medioambiental .....	44
4.1.2 - Salud humana.....	46
4.2 - Biodegradabilidad .....	50
4.2.1 - Modelos matemáticos.....	59
5 - LEGISLACIÓN.....	62
6 - MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL <i>LAS</i> .....	66
6.1 - Métodos volumétricos.....	66
6.2 - Métodos espectrométricos.....	67

---

6.3 - Métodos separativos.....	69
6.3.1 - Cromatografía de Gases .....	69
6.3.2 - Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	72
6.3.3 - Electroforesis Capilar.....	75
7 - TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....	78
7.1 - Extracción Asistida por el Ultrasonido.....	85
7.1.1 - Extracción asistida por el ultrasonido <i>versus</i> otras técnicas .....	104
7.2 - Extracción en Fase Sólida .....	108
7.2.1 - Fundamento de la Extracción en Fase Sólida.....	109
7.2.2 - Tipos de adsorbentes.....	111
8 - ASPECTOS TEÓRICOS INFLUYENTES EN LA MOVILIDAD DE UN COMPUESTO.....	122
8.1 - Adsorción.....	122
8.1.1 - Generalidades.....	122
8.1.2 - Factores que intervienen en los procesos de adsorción.....	124
8.1.2.1 - Propiedades del Adsorbato .....	124
8.1.2.2 - Propiedades del Adsorbente .....	125
A ) Arcillas .....	125
B ) Materia orgánica.....	127
C ) Óxidos e hidróxidos.....	127
8.1.2.3 - Condiciones del medio .....	127
A ) Temperatura.....	128
B ) Composición de la fase líquida en contacto con el adsorbente.....	128
C ) pH.....	128
8.1.3 - Cinética de adsorción .....	129
8.1.4 - Equilibrio de adsorción .....	130
8.1.4.1 - Isoterma de Langmuir.....	132
8.1.4.2 - Isoterma de Freundlich.....	135
8.1.4.3 - Isoterma lineal .....	137
8.1.4.4 - Otras isotermas.....	137
8.2 - Transporte de solutos .....	138

---

8.2.1 - Ecuación de transporte de solutos en medio poroso .....	138
8.2.2 - Modelo de equilibrio local .....	142
8.2.2.1 - Isoterma lineal .....	142
8.2.2.2 - Isoterma no lineal .....	143
8.2.3 - Modelos de no equilibrio.....	145
8.2.3.1 - Modelo de dos sitios.....	146
8.2.3.2 - Modelo de dos zonas (bizonal).....	149
9 - LA VEGA DE GRANADA.....	156
9.1 - Antecedentes históricos.....	156
9.2 - Características físicas y socioeconómicas de la Vega de Granada .....	157
9.3 - Calidad de las aguas subterráneas en la Vega de Granada .....	158
<b>CAPÍTULO 2 - EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>161</b>
1 - INTRODUCCIÓN.....	163
2 - DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS.....	163
2.1 - Disoluciones.....	163
2.2 - Reactivos.....	165
2.3 - Disolventes.....	167
3 - MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN.....	167
3.1 - Material de laboratorio .....	168
3.2 - Instrumentación.....	170
3.2.1 - Cromatógrafo de líquidos.....	170
3.2.2 - Sonda Ultrasónica Digital .....	171
3.2.3 - Equipo para Extracción en Fase Sólida .....	171
3.2.4 - Otros aparatos e instrumentos .....	172
4 - PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	173
5 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.....	174
5.1 - Métodos univariantes .....	174
5.2 - Métodos multivariantes.....	174



---

5.2.1 - Diseños experimentales.....	176
5.2.2 - Idoneidad del modelo.....	178
5.2.2.1 - Diseños de diagnóstico.....	180
5.2.2.2 - Diseños de superficie de respuesta.....	181
5.2.2.3 - Diseños mezcla.....	183
6 - CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO.....	184
6.1 - Rechazo de valores anómalos.....	186
6.2 - Función de calibración.....	187
6.3 - Parámetros de calidad del método analítico.....	190
6.3.1 - Rango dinámico lineal y Linealidad.....	190
6.3.2 - Precisión.....	191
6.3.3 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	192
6.3.4 - Límite de detección y cuantificación.....	193
7 - VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	202
7.1 - Ensayos de recuperación.....	202
7.2 - Metodología de adición patrón.....	203
<b>CAPÍTULO 3 - DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS ACUOSAS.....</b>	<b>209</b>
1 - INTRODUCCIÓN.....	211
2 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS EN EL PROCESO CROMATOGRÁFICO.....	211
2.1 - Selección de la fase estacionaria.....	211
2.2 - Estudio de la composición de la fase móvil.....	221
2.2.1 - Estudio del comportamiento de diferentes disolventes orgánicos sobre la resolución de LAS.....	221
2.2.2 - Estudio del comportamiento de diferentes modificadores de la fase móvil.....	225
2.2.3 - Estudio del comportamiento del SDS en la fase móvil.....	229
2.2.4 - Estudio del pH de la fase móvil.....	231
2.2.5 - Optimización del gradiente de composición de la fase móvil.....	231
2.3 - Influencia del flujo de la fase móvil.....	237

---

2.4 - Estudio de las longitudes de onda medida.....	242
2.5 - Influencia de la ganancia del tubo fotomultiplicador .....	244
2.6 - Influencia de la temperatura de la columna.....	245
2.7 - Influencia del volumen de inyección.....	246
2.8 - Influencia del porcentaje de metanol en el volumen de inyección.....	247
2.9 - Conclusiones generales .....	250
2.10 - Análisis cromatográfico para el LAS total .....	252
3 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS EN LA SPE.....	254
3.1 - Selección del volumen de eluyente (metanol) .....	254
3.2 - Procedimiento Operatorio para la Extracción en Fase Sólida .....	255
4 - PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS ACUOSAS.....	258
4.1 - Establecimiento y verificación del modelo.....	258
4.2 - Verificación del modelo.....	260
4.3 - Límite de detección y cuantificación.....	260
4.4 - Rango dinámico lineal y Linealidad.....	263
4.5 - Precisión.....	265
4.6 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	265
5 - VALIDACIÓN.....	265
5.1 - Calibrado con patrones (CP).....	266
5.2 - Calibrado con adición de patrón (CA) .....	266
5.3 - Calibrado de Youden (CY) .....	267
5.4 - Comprobación de la veracidad del método.....	267
<b>CAPÍTULO 4 - DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS SÓLIDAS.....</b>	<b>279</b>
1 - INTRODUCCIÓN.....	281
2 - METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS DE SUELOS.....	281
2.1 - Aspectos cromatográficos .....	282

---

2.2 - Aspectos sobre la purificación del extracto y preconcentración de los analitos .....	283
2.2.1 - Etapa de purificación física .....	283
A ) Filtración .....	283
B ) Centrifugación .....	286
2.2.2 - Etapa de purificación química .....	288
2.2.2.1 - Extracción en Fase Sólida con cartuchos SAX .....	289
A ) Flujo .....	291
B ) Concentración de HCl en la elución .....	292
2.2.2.2 - Extracción en Fase Sólida con cartuchos C <sub>18</sub> .....	294
2.2.2.3 - Extracción en Fase Sólida: Comparación de cartuchos .....	294
A ) Entre cartuchos C <sub>18</sub> .....	295
B ) Entre cartuchos SAX .....	296
2.2.2.4 - Extracción en Fase Sólida: Volumen de rotura .....	296
2.3 - Aspectos relacionados con la Extracción Asistida por el Ultrasonido .....	299
2.3.1 - Etapa previa a la extracción .....	299
2.3.2 - Etapa de extracción .....	300
A ) Tipo de extractante .....	302
B ) Tipo de cápsula de extracción .....	303
C ) Número de cápsulas de extracción .....	305
D ) Número de extracciones .....	306
E ) Análisis multivariante .....	307
2.3.3 - Reutilización de cartuchos .....	312
3 - PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS EN SUELOS AGRÍCOLAS .....	313
3.1 - Establecimiento y verificación del modelo .....	313
3.2 - Eficiencia de recuperación .....	315
3.3 - Verificación del modelo .....	317
3.4 - Límite de detección y cuantificación .....	317
3.5 - Rango dinámico lineal y Linealidad .....	318
3.6 - Exactitud: Precisión y Veracidad .....	319
3.7 - Sensibilidad o Resolución analítica .....	321
3.8 - Aplicación del método .....	322

---

<b>CAPÍTULO 5 - ESTUDIO DE CAMPO</b> .....	331
1 - INTRODUCCIÓN.....	333
2 - CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y DEL AGUA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.....	334
2.1 - Estudio del suelo empleado.....	334
2.1.1 - Propiedades físicas del suelo.....	335
A ) Textura.....	335
B ) Densidad aparente.....	338
C ) Densidad real.....	339
D ) Porosidad.....	340
E ) Humedad.....	340
F ) Ensayo de permeabilidad.....	341
2.1.1.1 - Resultados.....	342
2.1.2 - Propiedades químicas del suelo.....	343
A ) pH.....	343
B ) Materia orgánica.....	343
C ) Aniones y cationes solubles del suelo.....	344
D ) Nitrógeno total.....	345
E ) Determinación analítica de la capacidad de cambio.....	347
F ) Carbonatos.....	348
2.1.1.2 - Resultados.....	348
2.2 - Estudio del agua de pozo empleado.....	351
3 - ENSAYOS DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DEL LAS EN LABORATORIO ....	355
3.1 - Experiencia en discontinuo (tanque).....	355
A ) Relación suelo/disolución.....	356
E ) Determinación del tiempo de equilibrio (Cinética de adsorción).....	358
C ) Cinética de desorción.....	362
D ) Control del pH.....	364
F ) Isotermas de adsorción.....	365
G ) Isotermas de desorción.....	371
H ) Discusión de los resultados.....	375
3.2 - Experiencia en continuo (estudio con columna).....	378

---

A ) Estudios con trazador .....	385
B ) Estudios de adsorción y desorción de <i>LAS</i> .....	387
B.1 ) Resultados de los ensayos de adsorción .....	391
B.2 ) Resultados de los ensayos de adsorción .....	400
4 - EXPERIENCIA EN CAMPO .....	409
4.1 - Descripción de las parcelas experimentales .....	410
4.2 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de agua .....	411
4.2.1 - Características de los hidrocaptos estudiados .....	411
4.2.2 - Ensayos preliminares con los hidrocaptos .....	412
4.2.3 - Ensayo con trazador .....	422
4.2.4 - Ensayo con <i>LAS</i> .....	426
4.3 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de suelo .....	428
4.3.1 - Estudio estacional .....	431
A.1 ) Estudio realizado en el Otoño 2004 .....	433
A.2 ) Estudio realizado en el Invierno 2005 .....	435
A.3 ) Verano 2005 .....	437
A.3.1 ) Evolución de los parámetros ambientales .....	437
A.3.2 ) Evaluación del <i>LAS</i> .....	438
A.4 ) Otoño 2005 .....	442
A.4.1 ) Evolución de los parámetros ambientales .....	442
A.4.2 ) Evaluación del <i>LAS</i> .....	443
A.5 ) Invierno 2006 .....	447
A.5.1 ) Evolución de los parámetros ambientales .....	447
A.5.2 ) Evaluación del <i>LAS</i> .....	448
A.6 ) Primavera 2006 .....	452
A.6.1 ) Evolución de los parámetros ambientales .....	452
A.6.2 ) Evaluación del <i>LAS</i> .....	453
A.7 ) Riegos Sucesivos .....	457
A.7.1 ) Evolución de los parámetros ambientales .....	457
A.7.2 ) Evaluación del <i>LAS</i> .....	458
4.3.2 - Estudio comparado de los resultados de campo .....	462
4.3.3 - Evaluación de la microbiota del suelo .....	473
4.3.4 - Consideraciones finales .....	482

---

<b>CONCLUSIONES</b> .....	499
<b>ANEXOS</b> .....	505

---

---

**OBJETO DE LA TESIS**

---

---





El objeto de esta Memoria de Doctorado es el estudio del comportamiento medioambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (*LAS*) *in situ*, en una zona de especial relevancia por su interés agrícola. Este estudio está integrado en el Proyecto de I+D+I: “*EVOLUCIÓN QUÍMICA Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS SULFONATOS DE ALQUILBENCENO LINEALES (LAS) EN SUELO AGRÍCOLA. IMPLICACIONES AMBIENTALES*” (Ref. PPQ2003-07978-C02-01), financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Nace como consecuencia de diferentes reuniones científicas mantenidas entre el grupo de investigación de Química Analítica de la Universidad de Granada, QUÍMICA ANALÍTICA Y CIENCIAS DE LA VIDA, y el de PETRESA, presidido por su Director de I+D+I Dr. José Luís Berna Tejero. Su inquietud medioambiental, clarividencia de ideas y capacidad para anticiparse a todo tipo de problemática, determinó que, tras diversas reuniones, en 1998 se trazara las líneas maestras de este proyecto de investigación, donde se pretendía estudiar el impacto medioambiental de los tensioactivos de mayor interés comercial. Seis años después, a raíz de diferentes retenciones medioambientales surgidas en diversos grupos ecologistas noruegos y daneses se puso en marcha este primer estudio para el que se seleccionó el *LAS*.

Aunque el *LAS* es sin duda el tensioactivo más y mejor estudiado de la historia, hasta la fecha hay pocos estudios que abordan su comportamiento medioambiental *in situ*, en el lugar donde por diversas vías (fugas de alcantarillas, presencia de fosas sépticas, riego con aguas residuales y la aplicación de fangos de depuradora como fertilizante), se pueden incorporar los tensioactivos al medio.

Para la realización del estudio de campo se ha seleccionado un suelo de especial interés como es la Vega de Granada, que además de poseer una gran relevancia agrícola, esta regada con aguas residuales de procedencia urbana y por tanto con escasa o nula contaminación industrial con lo que no se introducen agentes tóxicos que puedan alterar su microbiota. Además, presenta una gran variedad climática a lo largo de todas las estaciones del año, lo que la hace especialmente útil y versátil a la hora de obtener conclusiones.

Por tanto, el objetivo principal del proyecto se centra en el estudio del comportamiento y distribución de LAS que se introduce a través de irrigación forzada, en una sección de terreno (zona no saturada y saturada) de una parcela agrícola de la Vega de Granada que reúne las condiciones idóneas para llevar a cabo la investigación propuesta.

Con este estudio se pretende por una parte mejorar la metodología existente para la detección y determinación de los homólogos e isómeros del LAS, y por otra profundizar en el conocimiento de los diferentes mecanismos (adsorción, precipitación, movilidad, fotodegradación, biotransformación aerobia, biotransformación anaerobia...) que pueden contribuir a facilitar o dificultar en su caso la biodisponibilidad de estos productos en el suelo. La comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio con los ensayos de campo, posibilitan realizar las correspondientes interrelaciones y poder establecer los diferentes mecanismos que justifiquen su comportamiento real en la zona no saturada. Un adecuado conocimiento de estos puede contribuir a la prevención de la contaminación de los acuíferos.

Para alcanzar el objetivo central se ha trazado una serie de objetivos secundarios:

**1 - Puesta a punto de la metodología analítica:**

- 1.1 - Determinación de *LAS* total, homólogos e isómeros en muestras de agua de pozo y agua residual.
- 1.2 - Determinación de *LAS* total, homólogos e isómeros en muestras de suelo.

**2 - Estudio del *LAS* en el laboratorio:**

- 2.1 - Estudios en tanque (*batch*). Establecimiento de las cinéticas e isothermas de adsorción.
- 2.2 - Estudios en columna: Establecimiento de los modelos para la lixiviación.

**3 - Estudio del *LAS* en campo:**

- 3.1 - Estudio del comportamiento del *LAS* en la zona saturada y no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada, a lo largo de todas las estaciones del año.
- 3.2 - Establecimiento de los modelos.
- 3.3 - Comparación con los modelos obtenidos en el laboratorio.



---

---

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN**

---

---



---

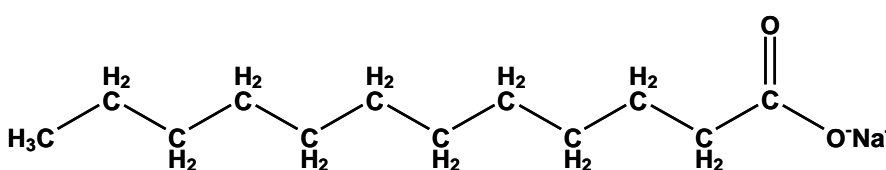
# **1 - DESARROLLO HISTÓRICO, CLASIFICACIÓN, CONSTITUCIÓN DE SUSTANCIAS CON CARÁCTER TENSIOACTIVO**

## **1.1 - Desarrollo histórico**

La limpieza es una actividad común a todos los seres vivos. En el caso de la especie humana ha evolucionado con el transcurso del tiempo permaneciendo unida y caracterizando a las diversas civilizaciones y culturas que han buscado aditivos que mejorasen la capacidad limpiadora del agua. Así, en el antiguo Egipto el símbolo que representaba la acción de lavar consistía en una figura humana con los pies sumergidos en agua, siendo éste por tanto el único agente de lavado conocido. Posteriormente se observó que se podía mejorar el rendimiento del lavado utilizando agua de lluvia, agua caliente o utilizando aditivos como la sosa.

El jabón ha sido el agente de lavado más usado por la humanidad aunque fue empleado durante mucho tiempo únicamente como cosmético (principalmente para decolorar el cabello y como remedio casero). El origen del jabón, definido como sal alcalina de un ácido graso, se sitúa indudablemente mucho antes de la Era Cristiana. Ya se comentaba su fabricación en una tablilla Sumeria 3000 años a.C., donde se describían las propiedades curativas de un “azufre jabonoso”. En Tello, Mesopotamia, se ha encontrado una laca de arcilla del año 2500 a.C. en la que se relata la fabricación del jabón, utilizando para ello aceite y la cantidad precisa de hierba jabonosa. En un papiro egipcio, aproximadamente del año 1500 a.C., y que constituye todo un tratado médico, se indica que, mezclando aceites animales y vegetales con ciertas sales (que debían ser alcalinas), se obtenía un producto de tipo jabonoso

útil para combatir enfermedades de la piel y también para el lavado. Existen referencias bíblicas acerca de ciertos productos líquidos alcalinos que poseían propiedades limpiadoras. Las sustancias constituyentes de los jabones, en general, eran obtenidas a partir del tratamiento de aceites o grasas (ésteres) con hidróxidos de metales alcalinos<sup>1</sup>. Su estructura típica es:



*Figura 1.1 - Estructura típica de los jabones*

Como se ha indicado, la manufactura del jabón es una de las síntesis químicas más antiguas. Cuando las tribus germánicas de la época de César hervían sebo de cabra con potasa, que obtenían por lixiviación de las cenizas del fuego de leña, efectuaban la misma reacción química realizada por los fabricantes de jabón modernos a una escala industrial: la hidrólisis de los glicéridos.

Las primeras referencias explícitas sobre la utilización de jabones con fines de limpieza se remontan al principio del cristianismo. El sabio romano Plinio el Viejo (23 - 79 d.C.), autor de la célebre “Historia Natural”, menciona la preparación de jabón a partir del cocimiento del sebo de carnero con cenizas de madera y, de acuerdo con su descripción, este procedimiento involucra el tratamiento repetido de esta pasta con sal, hasta obtener el producto final. Según él, los fenicios ya conocían esta

<sup>1</sup> Waite T.D., *Principles of Water Quality*. Academic Press Inc, New York, USA, pp. 86-91, 1984



técnica desde el año 600 a.C. En las ruinas de Pompeya, ciudad destruida aproximadamente en el año 79 d.C. por la explosión del Vesubio, los arqueólogos desenterraron una fábrica de jabón. Al parecer, los romanos no lo empleaban para la limpieza ya que la mayor parte se mezclaba con aromatizantes para cabellos y cosméticos o era adicionado a los empastes utilizados en el tratamiento de quemaduras y heridas, eventualmente se empleaba con finalidades de limpieza al lavarse el cuerpo de personas homenajeadas.

El médico griego Galeno (130 - 200 d.C.), que logró fama y fortuna en Roma, en su obra “*De simplicibus medicaminibus*”, describe una técnica según la cual el jabón podía ser preparado con grasas y cenizas, enfatizando su utilidad como medicamento para la remoción de suciedad corporal y de tejidos muertos en la piel. El alquimista árabe Geber (Jabir Ibn Hayyan), en manuscritos del siglo VIII, también menciona el jabón como agente de limpieza. También a los árabes se les atribuye la sustitución de las cenizas por la cal viva, permitiendo la elaboración de jabones más eficientes.

En España, los musulmanes preparaban jabones a partir de aceite de oliva, sin embargo, fue en ciudades costeras del Mediterráneo como Marsella, Génova, Venecia y otras, donde se desarrolló una importante industria jabonera gracias a la abundancia del aceite de oliva. A partir de ahí hubo dos grandes avances químicos que marcaron una revolución en la producción de jabones: 1) En 1791, el médico cirujano francés y aficionado a la química Nicolás Leblanc, concluyó el desarrollo de un método de síntesis de sosa (carbonato de sodio) a partir de la salmuera, proporcionando un procedimiento más barato, hecho por lo cual Leblanc es considerado por la comunidad científica como el fundador de la

Química Industrial; 2) Entre 1813 y 1823, el químico francés Michel-Eugène Chevreul, aclaró la composición química de las grasas naturales y demostró que su formación era debido a una reacción química, de modo que los fabricantes del siglo XIX pudieron tener una idea del proceso químico involucrado y disponer de la materia prima necesaria para su fabricación.

Más adelante el método Leblanc para obtención de sosa fue sustituido por el método de Ernest Solvay, un químico industrial belga, adquiriendo su primera patente para la producción de sosa en 1861. En ella se utilizaba como materias primas el cloruro sódico (sal común), el amoníaco y el carbonato cálcico (piedra caliza), consiguiendo abaratar aún más el proceso y eliminar algunos de los problemas que presentaba el método Leblanc.

Durante los siglos XVIII y XIX, la industria de los jabones sufrió un extraordinario desarrollo, ampliando la oferta a productos con distintas formas y variedades como: jabones duros, blandos, perfumados, etc. Debido a estos avances en la tecnología de fabricación con reducción de sus costes, hubo una mayor producción y consumo de estos productos, ocasionando una mejora en la higiene personal y, consecuentemente, contribuyendo al crecimiento exponencial de la población europea por disminución de las causas de mortalidad.

En 1878, en Alemania, fue elaborado un producto que además de contener jabón como uno de sus componentes, se complementaba con una innovación: la adición de silicato sódico (como recurso para reducir la dureza del agua, que disminuía el poder de detergencia de los jabones). Así, este producto denominado *Henkel's "Bleichsoda"*, puede ser

considerado como la primera formulación comercial. Este ablandamiento del agua se obtenía gracias a la precipitación de las sales de calcio y magnesio así como las de hierro, responsables de la tendencia a amarilllear la ropa.

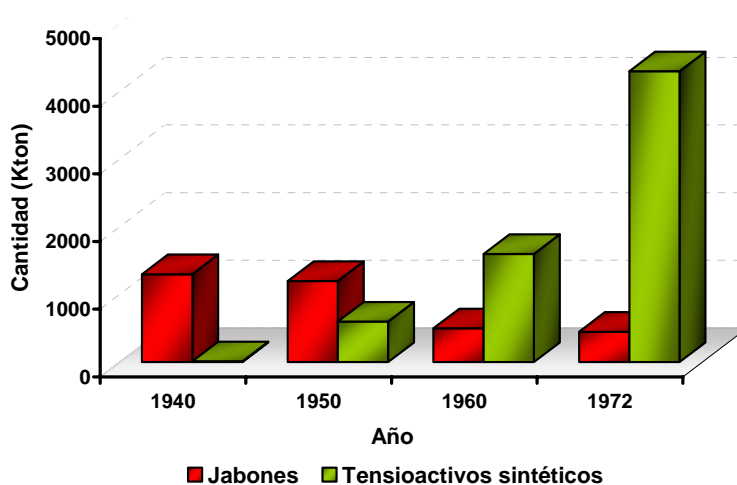
Durante la 1ª Guerra Mundial, como la obtención de las grasas era difícil en Alemania, ya que se utilizaban con fines nutritivos, los científicos empezaron a estudiar la posibilidad de desarrollar tensioactivos sintéticos para sustituir al jabón y así el químico Fritz Günther logró sintetizar el primer jabón artificial en el año 1916. Se trataba del compuesto diisopropil naftaleno sulfonato sódico, que presentaba mejores características que los jabones naturales, sin embargo, las cadenas cortas no conseguían el suficiente carácter tensioactivo. En seguida, surgieron los sulfatos de alcoholes grasos, descubiertos por Bertsch y colaboradores en 1928. En 1932, se comercializó el primer detergente para uso doméstico en los Estados Unidos de América, que fue desarrollado como respuesta a la necesidad de obtener un sustituto de los jabones en las zonas del país que presentaban alta dureza en el agua y por las noticias que llegaban de Alemania anunciando el descubrimiento de un tensioactivo artificial. Estos dos factores estimularon el desarrollo de la industria estadounidense de detergentes.

También en 1932, la empresa *Henkel* en Alemania comercializó alcoholes grasos como el oleico ( $C_{18:1}$ ) y el esteárico ( $C_{18:0}$ ) procedentes del aceite del esperma de ballena, extendiendo esta comercialización a los alcoholes grasos como el láurico y mirístico ( $C_{12:0}$  y  $C_{14:0}$ ) respectivamente, por presentar mejores propiedades.

El siguiente paso importante en el desarrollo de los tensioactivos fue la

introducción de máquinas automáticas de lavado. El cambio en las costumbres domésticas condujo a la necesidad imperiosa de sustituir gradualmente el jabón, muy sensible a la dureza del agua, por otros tensioactivos como los de origen sintético, con características más apropiadas.

En la siguiente figura se pueden observar los resultados referentes a la evolución de ventas tanto de jabones como de tensioactivos sintéticos. Se evidencia un enorme aumento en la producción de los tensioactivos sintéticos. Estos datos proceden de dos fuentes: una estadounidense “*American Soap and Detergent Association*” y otra alemana “*Henkel & Cie*”, desde 1940 a 1972<sup>2</sup>:



*Figura 1.2 - Evolución de la venta de jabones y tensioactivos sintéticos*

Basados en estos valores, se verifica que inmediatamente después de la 2<sup>a</sup> Guerra Mundial, se produjo un aumento notable en la fabricación de tensioactivos sintéticos frente a la de jabones naturales, presentando estos

<sup>2</sup> KIWI Web: [www.chemistry.co.nz/surfactants.htm](http://www.chemistry.co.nz/surfactants.htm)

últimos una tendencia de fabricación prácticamente constante, e incluso una ligera disminución.

Esta situación, junto a los relevantes progresos logrados por la humanidad gracias a la Medicina, a la Química y en gran medida a los hábitos higiénicos, condujo en los años 50 al desarrollo de nuevos productos de origen sintético con propiedades deterativas basados en el alquilbenceno ramificado (*BAB*, del inglés *Branched Alkylbenzene*). Este producto una vez sulfonado, originando el sulfonato de alquilbenceno ramificado (*BABS*, del inglés *Branched Alkylbenzene Sulphonate*), ya satisfacía la demanda del 60% del mercado mundial en 1950, pues presentaba unas propiedades deterativas muy buenas, aunque no exhibía un adecuado comportamiento en el medio ambiente. Una vez estudiados se comprobó que eran debidos a su falta de biodegradación y por ello, es considerado como "alquilato duro" o no biodegradable.

Este problema propició el desarrollo del alquilbenceno lineal (*LAB*, del inglés *Linear Alkylbenzene*) a principios de los 60. El producto lineal, tras ser sometido a un proceso de sulfonación, mantenía las excelentes propiedades deterativas del sulfonato de alquilbenceno ramificado y además se biodegradaba fácil y rápidamente. De esta forma nació el sulfonato de alquilbenceno lineal (*LAS*, del inglés *Linear Alkylbenzene Sulphonate*), el tensioactivo sintético de mayor producción mundial.

## 1.2 - Clasificación

El término surfactante es un neologismo o un anglicismo desarrollado a partir de 1950, proveniente de la contracción del término "agente de actividad superficial" (del inglés, *Surface Active Agent*) y actualmente

adoptado por la Real Academia Española<sup>3</sup>, que ha sido universalmente aceptado para describir sustancias orgánicas con ciertas características en su estructura capaces de modificar las propiedades físicas (mecánicas, eléctricas, etc.) de una superficie o de una interfase, reduciendo la tensión superficial. No obstante, la palabra designada en las todas las normativas europeas adoptadas desde de su principio hasta la actualidad, cita el término tensioactivo como la traducción de *surfactant*, razón por la cual en esta memoria se utilizará este término. Con mucha frecuencia se ha utilizado la palabra detergente en lugar de tensioactivo, sin embargo, siguiendo su definición de sustancia capaz de lavar, el detergente puede contener además sustancias inorgánicas que favorecen su acción detergente.

El tensioactivo típico es una molécula anfipática, es decir, en su composición hay dos zonas bien distintas: una hidrófila (extremidad polar que interacciona fuertemente con las moléculas de agua), y otra hidrófoba (cadena apolar de hidrocarburo que interacciona débilmente con las moléculas de agua).

Esta cadena alquílica (parte hidrófoba) está constituida básicamente por 12 - 20 átomos de carbono, pudiendo ser hidrogenada o fluorada, linear o ramificada, conteniendo o no doble enlace. Los grupos hidrófilos, pueden diferir bastante en su naturaleza química, pudiendo ser no iónicos, iónicos (catiónicos o aniónicos) o anfóteros.

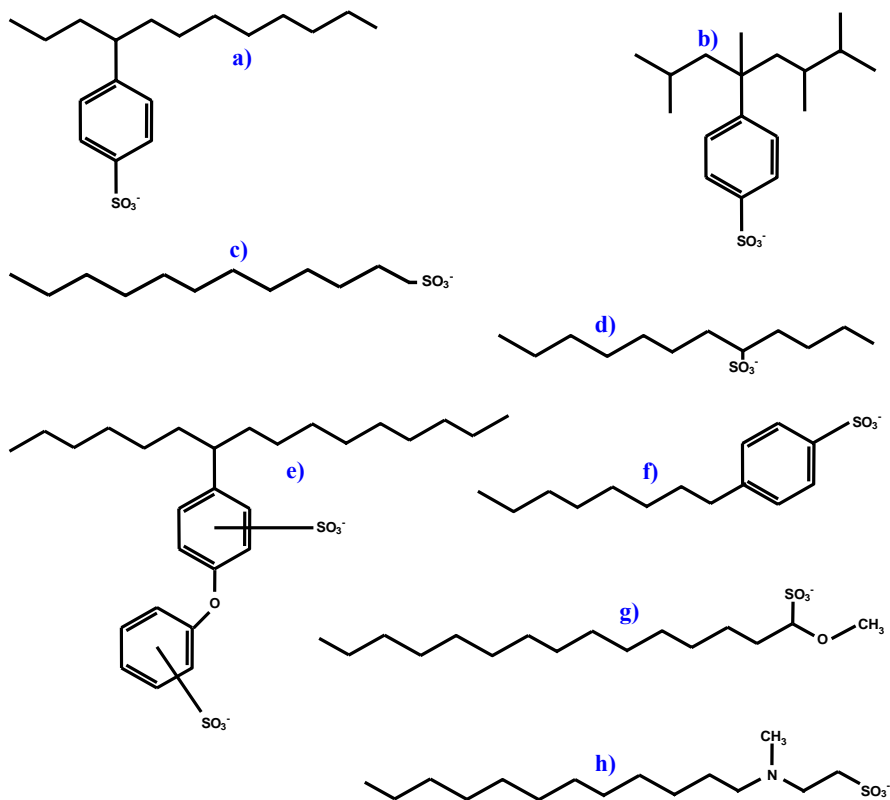
La clasificación de los tensioactivos puede realizarse atendiendo a la naturaleza de su grupo hidrófilo. Así se pueden clasificar en tensioactivos<sup>4</sup> no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros:

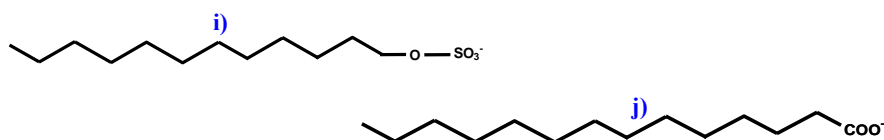
---

<sup>3</sup> Página web del Diccionario de la Real Academia Española: [http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO\\_BUS=3&LEMA=surfactante](http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=surfactante)

<sup>4</sup> Filipe E.J.M., *Quando as moléculas se auto-organizam: Micelas e outras estruturas supramoleculares*. Colóquio/Ciências nº18, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 25-38, 1996

⇒ **Tensioactivos aniónicos:** son los tensioactivos más ampliamente utilizadas a escala mundial. Se diferencian del resto, ya que la zona polar de este tipo de sustancias está cargada negativamente. El contraión (normalmente sodio, potasio o iones amonio) ejerce una escasa influencia sobre las propiedades superficiales de estas sustancias. Hoy en día este grupo polar negativo suele ser un grupo sulfato o sulfonato, como en el caso del LAS; aunque, tradicionalmente consistían en grupos carboxilato presentes en los jabones que se sintetizaban a partir de sebo de animales. Dentro de este grupo hay una subdivisión ya que se pueden encontrar tensioactivos aniónicos como los jabones, los sulfonatos de alquilbenceno lineal, los alcoholes etoxisulfatos (AES) y los alcoholes sulfatos (AS). A continuación se recogen algunos ejemplos de tensioactivos aniónicos:





**Figura 1.3** - Ejemplos de tensioactivos aniónicos: a) Sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS); b) Sulfonato de alquilbenceno ramificado; c) Sulfonato de 1-n-alquilo; d) Sulfonato de alquilo secundario; e) Difeniléterdisulfonato de hexadecano lineal; f) Sulfonato de 4-(1-n-octil)benceno; g) Sulfonato de metiléster; h) Taurato de alquilmetil; i) Sulfato de n-alquilo; j) Carboxilato de alquilo (jabón)

Los jabones usados tradicionalmente tienen una serie de ventajas:

- Son muy biodegradables cuando se encuentran en disolución.
- Poseen cierta acción bactericida.
- No necesitan la adición de agentes que mantengan la suciedad en suspensión.

Sin embargo también presentan una serie de inconvenientes como son:

- Forman compuestos insolubles con las sales cálcicas y magnésicas debidas a la dureza del agua, lo que dificulta enormemente su acción detergente, provocando incrustaciones e impidiendo su biodegradabilidad.

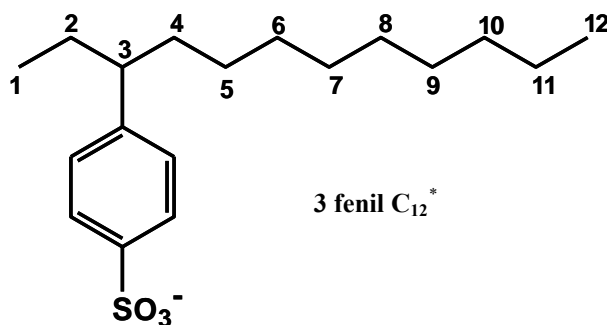
Entre los tensioactivos aniónicos, el sulfonato de alquilbenceno lineal es uno de los más ampliamente utilizados en el mundo. El LAS presenta un proceso de fabricación a partir de tecnologías petroquímicas ampliamente establecidas. Su comportamiento tensioactivo se debe a su carácter



anfipático, es decir, a la diferente solubilidad que poseen las dos partes principales de que consta su molécula: una parte hidrófila que consiste en un grupo sulfónico polar ( $-\text{SO}_3^-$ ) unido al benceno en posición *para*; respecto a la parte hidrófoba, ésta consiste en una cadena alquílica lineal de longitud variable y a la que se une el anillo bencénico en distintas posiciones.

La mezcla comercial de *LAS* contiene una serie de homólogos que difieren en la longitud de la cadena alquílica, siendo los más habituales los comprendidos entre 10 y 13 átomos de carbono y a su vez cada uno de ellos es una mezcla de isómeros surgidos en función de la distinta posición en la que el anillo bencénico está unido a esta cadena lineal.

Un ejemplo de los componentes del *LAS* se describe en la **Figura 1.4**.

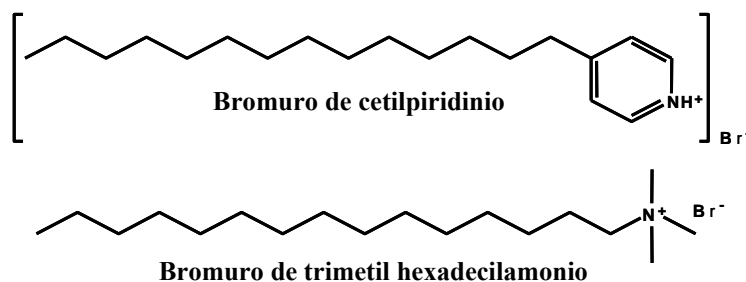


**Figura 1.4** - Ejemplo de isómero de *LAS*. \* Normalmente se abrevia como 3ØC12

Otros ejemplos de tensioactivos aniónicos son los alcoholes sulfatos (grasos) de cadena larga, obtenidos a partir de alcoholes grasos. Estos tensioactivos son utilizados extensivamente en productos de higiene personal como pastas de dientes, champús, aunque también se utilizan en detergentes en polvo, compactos y tabletas. El rango de cadena alquílica

es de 12 a 18 carbonos. También hay otros grupos que corresponden a los sulfonatos de olefinas, sulfonatos de *alfa* olefinas, éteres sulfonatos, sulfosuccinatos, alcanos sulfonatos, ésteres fosfatos y alquil isetonatos.

⇒ **Tensioactivos catiónicos:** Este tipo de sustancias están compuestas de una parte polar hidrófila cargada *positivamente*, normalmente una sal de amonio cuaternaria, amina o sal de fosonio, unida a una zona hidrófoba que puede tener distinta naturaleza. En disoluciones ácidas, tensioactivos no iónicos pueden adoptar carácter catiónico debido a la protonación del heteroátomo, sin embargo estrictamente hablando, tensioactivos catiónicos son aquellos que para poseer carga positiva no requieren de protonación. Su uso es menos extendido, siendo utilizado principalmente en la industria textil como ablandadores de fibras, actuando sobre la fibra de algodón, adhiriéndose a ella y confiriéndole cierta lubricidad y suavidad, de aquí su utilización en formulaciones de productos suavizantes (principal aplicación). A este tipo de compuestos también se le atribuyen propiedades antibacterianas, por ello se usan en microbicidas y herbicidas. También se usan como inhibidor de la corrosión, inhibidor de procesos de oxidación, dispersante y son muy utilizados en procesos de síntesis como agente transferente entre fases. Ejemplos de este tipo de sustancias son:



**Figura 1.5 - Ejemplos de tensioactivos catiónicos**

⇒ **Tensioactivos anfóteros:** Este tipo de compuestos poseen grupos funcionales que pueden ionizarse con carga negativa o positiva dependiendo de las condiciones del medio, por tanto pueden actuar como tensioactivos aniónicos o catiónicos. Pueden ser clasificados como: *anfolitos* o *betainas*. Anfolitos son compuestos que poseen al menos un protón activo. El ejemplo mejor conocido es el ácido amino carboxílico, que actúa como tensioactivo catiónico a bajos valores de pH, y como tensioactivo aniónico a altos valores de pH. Su uso en la industria es más restringido debido a su alta sensibilidad a cambios en el valor del pH del medio.

Las betainas no poseen protones hidrolizables, adquieren naturaleza catiónica en medios fuertemente ácidos. No son sensibles a la dureza del agua al valor de pH a que comúnmente se trabaja en la industria, son sólo débilmente tóxicas, compatibles con piel y membranas mucosas además de poseer propiedades antibacterianas. Son compatibles con otros tipos de tensioactivos y presentan buenas propiedades espumantes y detergentes. A continuación se representa la estructura básica de las betainas:

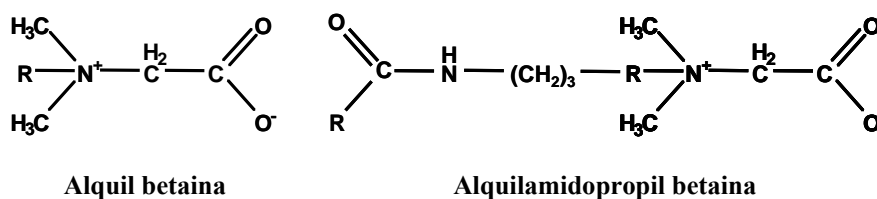
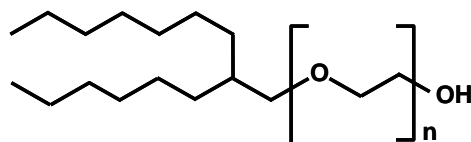


Figura 1.6 - Ejemplos de tensioactivos anfóteros

⇒ **Tensioactivos no iónicos:** Son sustancias que no están ionizadas en disolución, la polaridad del átomo de oxígeno unido covalentemente en los oligoetilenglicol éteres (también denominados poliglicol éteres) y

compuestos oligohidróxidos, o los átomos de oxígeno enlazados a heteroátomos, le confieren a estos tensioactivos no iónicos su solubilidad en agua como resultado de la hidratación de estos grupos por moléculas de agua. El grado de hidratación decrece con el aumento de la temperatura, disminuyendo por tanto la solubilidad en agua. La parte lipofílica debe tener una longitud que esté en consonancia con el número de grupos polares que posea el tensioactivo en cuestión, para evitar que aparezcan problemas de insolubilidad de la molécula. Los tensioactivos de este tipo más ampliamente utilizados son los alcoholes etoxilatos (AE). Dependiendo del grado de etoxilación se obtienen productos con un balance hidrófilo-lipófilo distinto con múltiples aplicaciones.

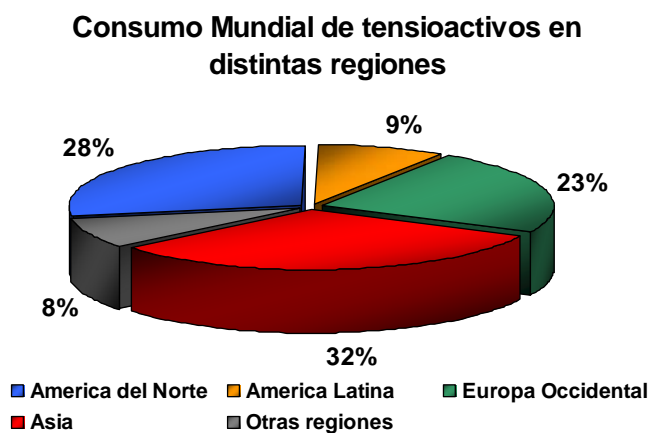
Se producen a partir de la condensación de óxidos de etileno, aunque también existen ciertos compuestos de este tipo basados en azúcares, polioles, etc. Los productos con menor peso molecular se encuentran en estado líquido, a medida que se incrementa su peso molecular tienden a ser más pastosos hasta llegar a un estado sólido céreo. Forman micelas con mayor facilidad que los tensioactivos iónicos debido a que las repulsiones electrostáticas en la superficie de estas son menores. Este tipo de compuestos son menos sensibles a la dureza del agua que los tensioactivos aniónicos. También poseen menor poder espumante, por ello pueden ser utilizados como reguladores de esta característica. A continuación se muestra un ejemplo de un tensioactivo no iónico:



**Alcohol etoxilado**

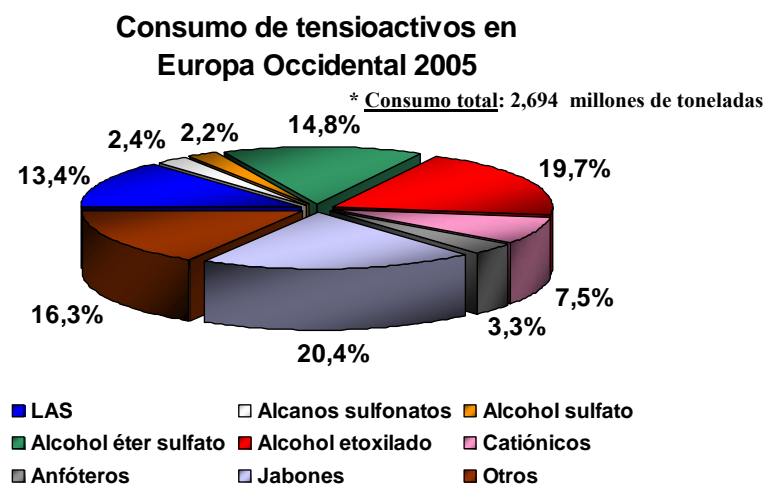
*Figura 1.7 - Ejemplo de tensioactivo no iónico*

En el siguiente diagrama se puede observar la distribución del consumo mundial total de tensioactivos<sup>5</sup> en los diferentes continentes:



*Figura 1.8 - Consumo mundial de tensioactivos por regiones (excluyendo los jabones)*

A continuación se representa la distribución de tensioactivos consumidos en Europa Occidental<sup>6</sup>:

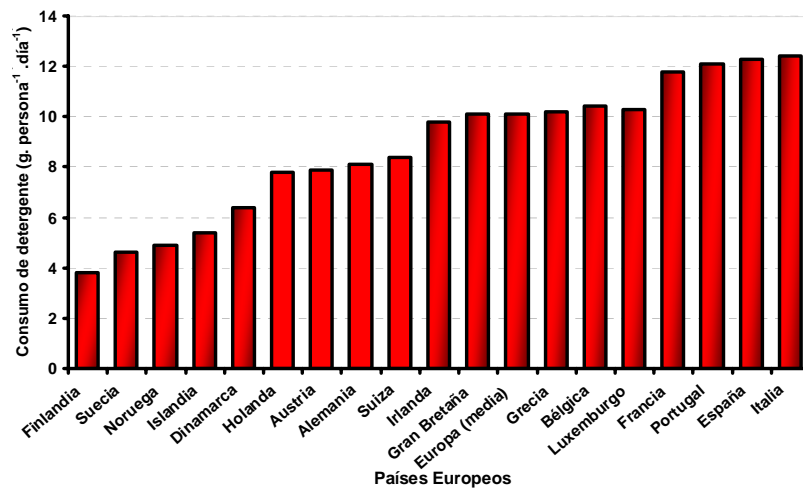


*Figura 1.9 - Distribución del consumo de tensioactivos en el Mercado Europeo*

<sup>5</sup> ECOSOL (European Council of Studies on LAB/LAS), Statistics, Brussels, Belgium, 2001

<sup>6</sup> CESIO, General Assembly, Santiago de Compostela, Spain, September 2006

Y en la siguiente figura se puede apreciar el consumo<sup>7</sup> *per capita* de detergentes en los diferentes países de Europa Occidental:



*Figura 1.10 - Consumo per capita de detergente en los países europeos*

### 1.3 - Capacidad deterdora

La capacidad deterdora del *LAS* radica en su elevado poder de humectación, emulsificación y dispersión. Muchas de las manchas aceitosas o grasientas son líquidas a temperaturas inferiores a 40 °C. Investigaciones termoanalíticas han demostrado que incluso las grasas sólidas a temperatura ambiente contienen cantidades sustanciales de material líquido. Estas sustancias humedecen los sustratos textiles muy eficazmente, y tienen tendencia a difundirse sobre la superficie formando láminas más o menos tupidas. Por esta razón las siguientes observaciones pueden considerarse aplicables a residuos tanto sólidos como líquidos.

<sup>7</sup> Berna J.L., *European Environmental Safety Legislation*, Handbook of Detergents. Marcel Dekker Inc. New York, USA, C.12, p. 318, 2003

La suciedad que se encuentra en la ropa está formada principalmente por partículas de grasa incrustadas en las fibras de tejido, esta sustancia grasa no puede ser eliminada simplemente con agua debido a su insolubilidad. Sin embargo, estos agentes tensioactivos disminuyen la tensión superficial del medio incrustándose el extremo apolar lipofílico de la molécula de tensioactivo en la suciedad, y quedando expuesto el extremo polar soluble en agua de manera que solubiliza la sustancia a eliminar del tejido.

El poder de humectación del *LAS* es un aspecto muy a tener en cuenta en el proceso de lavado ya que para que este proceso sea eficaz, la fibra textil debe entrar en contacto íntimo con la disolución de lavado. Este proceso depende de la temperatura, concentración de tensioactivo y del sustrato.

El mecanismo de “*rolling-up*”<sup>8</sup> consiste en la eliminación de la mancha aceitosa o sólida del tejido. Se produce como consecuencia de la disminución de la tensión superficial provocada por el tensioactivo. Como consecuencia de esto, el ángulo de contacto que forma el borde de la película de grasa que conforma la mancha comienza a crecer provocando así la formación de gotas y su posterior desprendimiento del tejido. Se puede considerar que este proceso consta de cuatro fases:

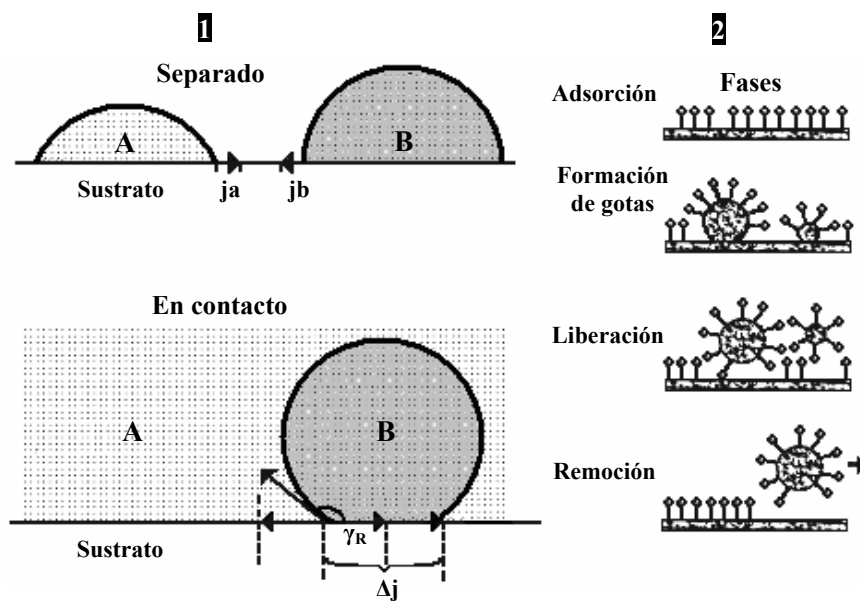
- En la primera fase el *LAS* es adsorbido por la película de grasa y por el sustrato.
- En la segunda, la película de grasa se reduce hasta adquirir forma de gotas bajo la influencia del *LAS*, manteniéndose su adsorción tanto en la superficie del tejido como sobre las gotas así formadas.

---

<sup>8</sup> Berth P., Jeschke P., *Consumption and fields of application of LAS*. Tenside Surf. Det. 26; 75-79, 1989

- En la tercera fase, las fuerzas de repulsión entre las gotas de grasa y el sustrato, ambas cargadas con tensioactivo, comienzan a ser tan intensas que se produce la eliminación de la mancha del tejido.
- Por último, las propiedades emulsionantes del LAS comienzan a actuar para que las gotas de suciedad cargadas de tensioactivo sean emulsionadas y puedan así ser arrastradas por la disolución de lavado sin riesgo de que sean redepositadas sobre el tejido.

Este proceso puede ser representado mediante la **Figura 1.11**.



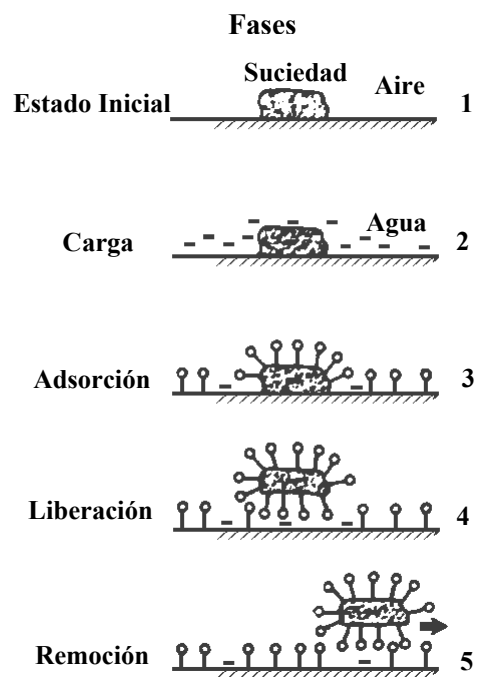
**Figura 1.11 - 1:** Esquema del fenómeno de "rolling-up" producido cuando la disolución del tensioactivo en medio acuoso (A) y el residuo aceitoso (B) entran en contacto. **2:** Esquema de las diferentes fases del proceso de eliminación de un residuo aceitoso depositado sobre una fibra textil

El LAS posee unas propiedades emulsionantes muy pronunciadas incluso a bajas concentraciones. Genera emulsiones estables particularmente en



disoluciones con elevada dureza. Este aspecto es importante por ser el responsable de evitar la redeposición de las manchas ya eliminadas.

El proceso de eliminación de partículas sólidas es similar al ya descrito. Sin embargo en este caso, el proceso de limpieza comienza con la acumulación de carga negativa sobre las partículas sólidas y sobre el tejido o superficie sólida (vidrio, porcelana, metal, etc.) a limpiar. Esto sucede gracias a distintas adsorciones del *LAS* sobre las diferentes superficies. Como consecuencia de este proceso de carga y adsorción, los potenciales interfaciales (potenciales- $\zeta$ ) son alterados de manera que se permite la eliminación de la partícula cargada de *LAS* del sustrato gracias al arrastre realizado por disolución de lavado. Este proceso se puede representar de manera esquematizada en la **Figura 1.12**.



**Figura 1.12** - Remoción de una partícula sólida

#### 1.4 - Constitución de los Detergentes: Tensioactivos y Componentes Complementarios

Las actuales formulaciones comerciales de productos de limpieza, tanto líquidas como sólidas, están constituidas generalmente por una mezcla de uno o varios tensioactivos que actúan mejorando la acción detergente y una serie de componentes complementarios: los aditivos, los coadyuvantes y los auxiliares de presentación (como los blanqueantes, enzimas, etc.), que conforman un producto no sólo con mejores características de limpieza sino con mayor seguridad tanto para el consumidor, como para los equipos y el medio ambiente. En estas formulaciones complejas donde coexisten dos o más agentes tensioactivos, incluso pertenecientes a distintos grupos (aniónicos y/o no iónicos), se suele proporcionar un efecto sinérgico aumentando su poder detergente.

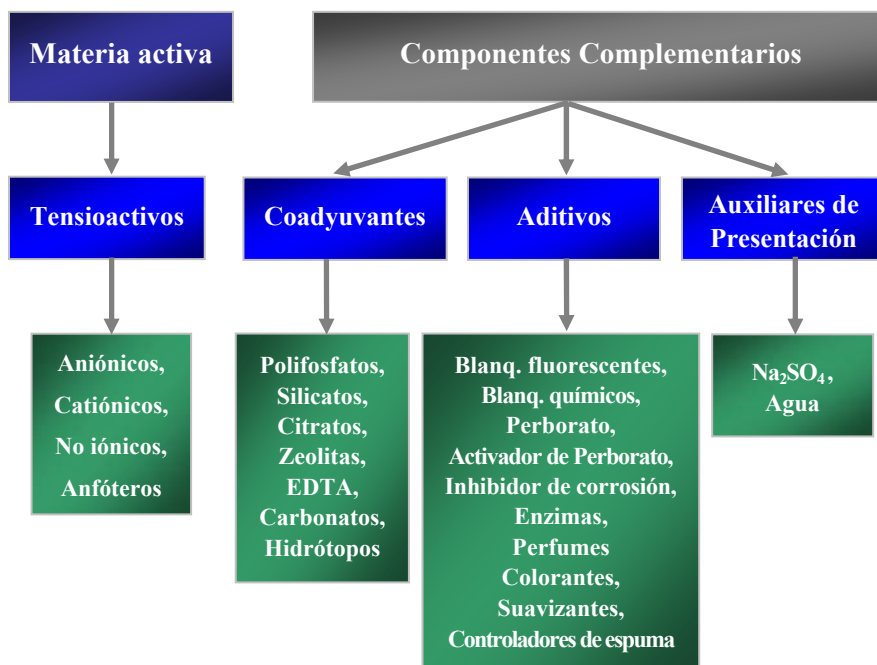
Los detergentes modernos, tanto líquido como en polvo, contienen entre un 5 - 20% en peso de tensioactivos. De esta manera, una concentración de detergente doméstico de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , originará una agua de lavado con 1 gramo de tensioactivo para cada litro, es decir un 0.1% en peso.

Normalmente en estas formulaciones se encuentran un gran número de aditivos que acompañan al tensioactivo. Estos compuestos que pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, desempeñan una función muy importante sobre la mejora de las propiedades detergentes de estos preparados comerciales.

En la **Figura 1.13** se puede apreciar un esquema sobre los componentes de las formulaciones actuales de tensioactivos según Domínguez<sup>9</sup>:

---

<sup>9</sup> Domínguez J.J.G., *Tensioactivos y Detergencia*, Ed. Dossat S.A., Madrid, España, p. 166, 1986



*Figura 1.13 - Componentes de formulaciones de tensioactivos*

## 2 - SULFONATO DE ALQUILBENCENO LINEAL (LAS). SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

### 2.1 - Síntesis

La síntesis del LAS comprende tres pasos fundamentales: la obtención de parafina, la síntesis del alquilbenceno lineal (LAB) y la sulfonación posterior de éste originando, finalmente, el sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS).

#### 2.1.1 - Obtención de parafina:

La materia prima para la síntesis del LAB, la n-parafina, proviene habitualmente

de la destilación del crudo de petróleo, donde la fracción de queroseno es tratada a través de tamices moleculares u otros dispositivos que separan estas cadenas lineales de las ramificadas. El procedimiento más utilizado y que emplea PETRESA (principal productor mundial de LAB, en su planta de San Roque-España) para la obtención de n-parafinas de rango C<sub>10</sub> - C<sub>17</sub>, se basa en el proceso Molex de *Universal Oil Products (UOP)*, donde el queroseno, materia prima inicial, es sometido a un hidrotratamiento para eliminar impurezas, especialmente azufre que puede ocasionar daños en los tamices moleculares y, posteriormente se realiza la extracción de las n-parafinas mediante un proceso de adsorción selectiva sobre tamices moleculares.

Todas las n-parafinas obtenidas por este procedimiento son de alta pureza (alrededor del 96 - 99%). Por este motivo son productos que se pueden utilizar como disolventes en una gran cantidad de aplicaciones.

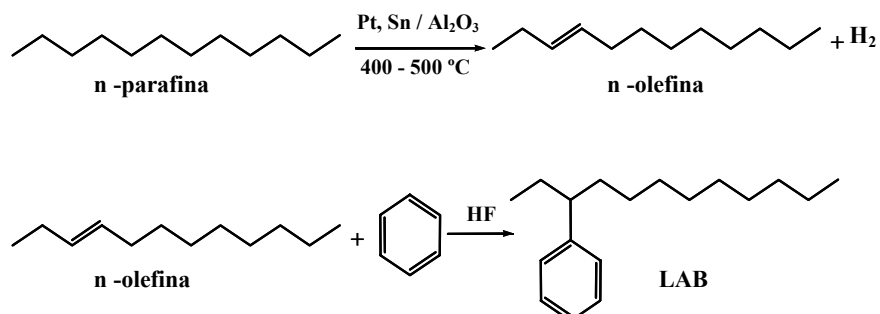
### **2.1.2 - Síntesis del alquilbenceno lineal (LAB):**

El primer proceso empleado para sintetizar el alquilbenceno lineal (LAB), se basaba en la alquilación del benceno con cloroparafinas lineales, utilizando cloruro de aluminio como catalizador.

Posteriormente, *Universal Oil Products (UOP)* desarrolló un método en el que se empleaba ácido fluorhídrico como catalizador<sup>10</sup>. El proceso se puede esquematizar como se indica a continuación:

---

<sup>10</sup> Cavalli L., Clerici R., Radici P., Valtorta L., *Update on LAB/LAS*. Tenside Surf. Det. 36; 254-258, 1999



**Figura 1.14** - Esquema del proceso de síntesis del LAB

En el proceso de deshidrogenación necesario para poder alquilar el benceno, la posición del doble enlace que se forma es aleatoria.

En la década de los años 90 se desarrolla un método entre PETRESA y UOP que utiliza un catalizador sólido en lecho fijo<sup>11</sup> para la alquilación del benceno con olefinas lineales. Este método evita el siempre complejo manejo del ácido fluorhídrico. Además, este proceso proporciona ventajas tales como: simplificación del proceso de fabricación, mejora del rendimiento y de la calidad del producto final. Dependiendo del proceso de síntesis utilizado, las propiedades físicas del producto final serán diferentes, tal y como se describen de manera resumida en el apartado siguiente.

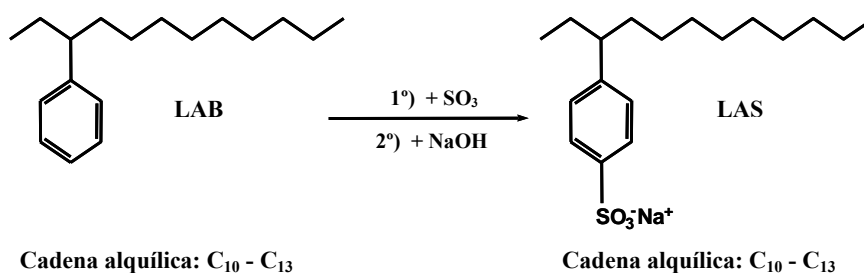
### **2.1.3 - Síntesis del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS):**

El LAS se obtiene por sulfonación del LAB. Inicialmente se empleaba óleum (ácido sulfúrico fumante) así como ácido sulfúrico como agentes

<sup>11</sup> Erickson L.C., Banerji A., Fritsh T.R., Berna J.L; *New solid-bed alkylation technology for LAB*; 4<sup>th</sup> Cesio World Surf. Congress, Barcelona, Spain, V.1, p. 177, 1996

sulfonantes tanto en reactores en discontinuo como en el llamado “sistema de cascada”. Desde la década de los años 60 la tecnología de la sulfonación ha mejorado considerablemente con el empleo de reactores de película descendente (*FFR*, del inglés *Falling Film Reactors*) más eficaces y con sulfonación en estado gaseoso.

Mediante la sulfonación del *LAB* se obtiene el correspondiente ácido sulfónico (*HLAS*) que posteriormente es neutralizado obteniendo, finalmente, el *LAS*, según la reacción:



*Figura 1.15 - Esquema del proceso de síntesis del LAS*

El grupo sulfónico entra normalmente en la posición “*para*” por ser la menos impedida. Al ser una reacción muy exotérmica ( $40.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), el sistema de refrigeración del reactor debe actuar con suma eficacia para evitar hipersulfonaciones y en consecuencia evitar así un deterioro de la calidad final del producto.

El “ácido sulfónico de alquilbenceno” - *HLAS* obtenido, tiene una consistencia líquida con un alto contenido activo ( $> 97\%$ ), alrededor del 1% de materia sin sulfonar y entre un 1 - 2% de ácido sulfúrico.

El ácido sulfónico formado, se neutraliza después, generalmente con NaOH,

dando lugar al correspondiente sulfonato sódico. Esta operación se lleva a cabo en la mayoría de los casos en las propias fábricas de detergentes.

## 2.2 - Propiedades físicas<sup>12, 13</sup> y químicas del LAS

⇒ **Peso molecular:** Considerando la fórmula molecular media de los diferentes homólogos existentes:  $(C_{11.6}H_{24.2})C_6H_4SO_3Na$  el peso molecular es  $342.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . En la siguiente figura se representa la molécula del LAS:

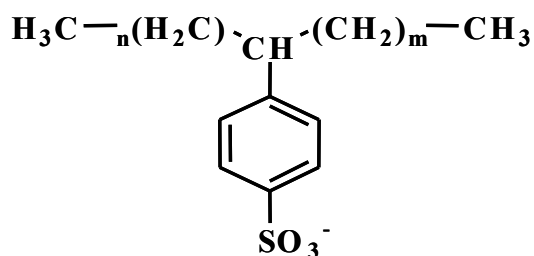


Figura 1.16 - Molécula de LAS

⇒ **Presión de vapor a 25 °C:** Este valor varía entre  $(3 \text{ y } 7) \cdot 10^{-13} \text{ Pa}$ . Este parámetro se refiere al homólogo  $C_{12}$ .

⇒ **Punto de fusión:** La mezcla comercial de LAS funde a  $277 \text{ °C}$ .

⇒ **Punto de ebullición:**  $637 \text{ °C}$ .

⇒ Un parámetro importante es el **coeficiente de partición en octanol-agua  $K_{ow}$** , a partir del cual se pueden calcular diferentes parámetros teóricos como la constante de adsorción  $K_d$ . El valor de  $K_{ow}$  es 3.32.

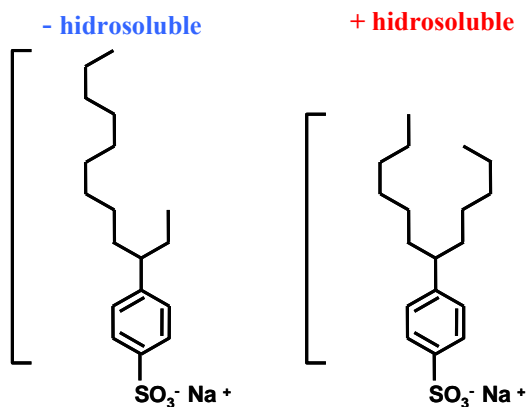
<sup>12</sup> IUCLID (The International Uniform Chemical Information Database), 1994

<sup>13</sup> SIDS (Screening Information Data Sets), Sponsor Country: USA, Dossier on LAS (draft), 1999

⇒ **Densidad:** La pasta de ácido sulfónico posee una densidad de  $1.06 \text{ Kg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

⇒ **Viscosidad:** El valor de este parámetro es similar para todos los ácidos sulfónicos que componen el *LAS*, oscilando sobre los 1000 centipoises a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

⇒ **Solubilidad en agua:**  $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esta propiedad varía dependiendo de la longitud de la cadena alquílica y del proceso de fabricación. A medida que aumenta la longitud de la cadena de carbono unida al anillo bencénico disminuye la solubilidad en agua. Además, dentro de una misma familia de homólogos, los isómeros que poseen el anillo bencénico unido a la cadena alquílica en las posiciones más internas tienen un carácter más hidrofílico, ya que la longitud efectiva de la cadena de carbonos es menor. Esto se representa esquemáticamente en la siguiente figura:



**Figura 1.17** - Efecto de la posición del anillo bencénico sobre la longitud efectiva de la cadena de carbono

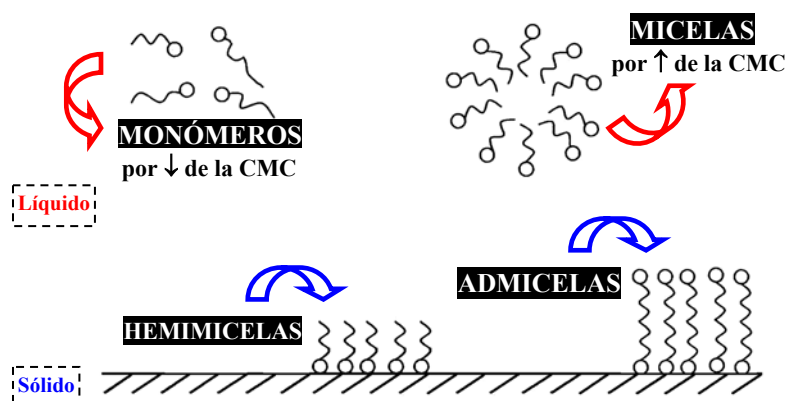
El proceso de fabricación donde se utiliza ácido fluorhídrico produce



alquilatos con bajo contenido en 2-fenil alcanos (16 - 18%), mientras que el catalizador de lecho fijo proporciona alquilatos con alto contenido en 2-fenil alcanos (27 - 30%). Esta variable tiene una repercusión directa en las propiedades físicas de las pastas, especialmente sobre la solubilidad. Así, los alquilatos de alto contenido en 2-fenil alcanos producen pastas más solubles, una vez sulfonados y neutralizados, que los de bajo contenido, para un mismo peso molecular. Un aumento en la solubilidad de las pastas los hace especialmente atractivos para formulaciones líquidas de alto ingrediente activo o concentradas.

⇒ **Concentración Micelar Crítica (CMC):** Esta es una propiedad característica de sustancias con carácter anfipático como es el caso de *LAS*. Este tipo de moléculas con regiones lipofílicas e hidrofílicas poseen un comportamiento particular cuando se encuentran en disolución, ya que cada zona de la molécula con diferente solubilidad trata de distribuirse en el medio (sea acuoso o no) de manera que las colas lipofílicas se agrupen entre sí, al igual que los grupos hidrofílicos entre sí, formándose de esta forma a partir de una determinada concentración un conglomerado de estructura definida que recibe el nombre de *micela*. Cuando la cadena alquílica lineal consta de menos de 6 carbonos se pierde este carácter anfipático y deja de tener actividad tensioactiva. Estas micelas pueden tener formato esférico (a bajas concentraciones) o elipsoidal (a altas concentraciones de tensioactivo o en presencia de electrolitos). Gracias a las propiedades espaciales de estas micelas, presentan un alto poder solubilizante de sustancias insolubles en fase acuosa, además de su capacidad de solubilización selectiva de diferentes especies químicas. Para la mezcla comercial de *LAS*, este valor de CMC varía de: 160 - 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Por debajo de este intervalo, el

tensioactivo se encuentra en forma de monómeros<sup>14</sup>. A continuación se representa este proceso.



*Figura 1.18 - Ejemplo del proceso de micelización de un tensioactivo*

### 3 - CONSUMO Y APLICACIONES DEL LAS

El consumo mundial del LAS en el año 2005<sup>6</sup> fue de 2.5 millones de toneladas, habiendo una proyección de consumo de cerca de 3.4 millones de toneladas para el año 2010<sup>15</sup>, cifras que ponen de manifiesto que el LAS<sup>16</sup> es uno de los tensioactivos más utilizados en el mercado mundial de detergentes, después del jabón.

En cuanto al consumo total en Europa Occidental, fue calculado un valor de 360 kton en el año 2005<sup>6</sup>.

<sup>14</sup> Fernández A., Schulman S.G., *Fosforescencia Molecular Analítica: Una aproximación Práctica*, Ed. Unv. Gr., Granada, España, 2001

<sup>15</sup> Penteadó J.C.P., Seoud O.A.E., Carvalho L.R.F., *Linear alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis*. Quím. Nova 29; 1038-1046, 2006

<sup>16</sup> Berna J.L., *European Environmental Safety Legislation*, Handbook of Detergents. Marcel Dekker Inc. New York, USA, C.12, p. 318, 2003

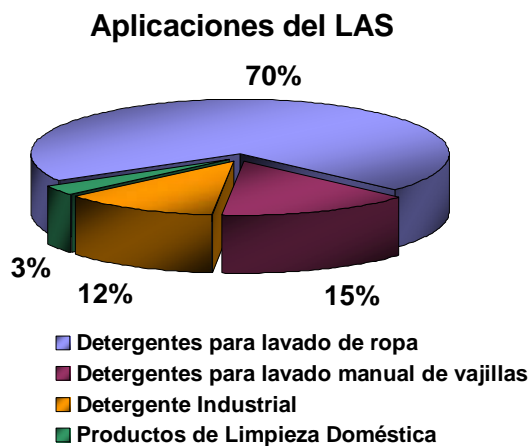
El *LAS* es utilizado principalmente en forma de sales sódicas y ocasionalmente potásicas, amónicas, magnésicas o de trietilamina (TEA). Comúnmente, en productos de limpieza, se utilizan formulaciones donde la cadena alquílica posee un número de carbonos de entre 10 y 13. Alquilbencenos con más de 14 carbonos son poco solubles en agua, aunque si solubles en disolventes orgánicos. Disoluciones en aceite mineral son ampliamente usadas como lubricantes en procesos industriales de corte y taladrado de metales.

Es empleado en diversos tipos de formulaciones de detergentes para lavado de ropas, incluyendo polvos de alta y baja densidad, líquidos, líquidos concentrados, pastas y barras y su uso está relacionado con su elevada eficacia limpiadora. Aún dentro del sector de limpieza doméstica, el *LAS* es utilizado en la formulación de detergentes para el lavado manual de vajillas. El *LAS* también se encuentra en la formulación de detergentes del sector industrial e institucional (lavado de ropa y limpieza de superficies) como también en pesticidas agrícolas, en procesos específicos de limpieza, en la preparación de emulsiones para fluidos lubricantes, en el procesamiento de metal y flotación de minerales. Es utilizado, asimismo, como agente emulsionante en las reacciones de polimerización, en el sector petroquímico.

En el siguiente diagrama se representa la distribución de las distintas aplicaciones<sup>17</sup> del *LAS*, en los detergentes.

---

<sup>17</sup> Relatório Final. *Problemática dos tensoactivos em Portugal: Proposta de tratamento prévio de um efluente industrial com elevados teores de tensoactivos com vistas à sua reutilização*. Portugal, p.23, 2000.



*Figura 1.19 - Aplicaciones del tensioactivo LAS en detergentes*

En cuanto a la selección del tensioactivo o de los tensioactivos empleados en una formulación comercial dependerá, por parte de los fabricantes, de la ponderación de sus costes y propiedades particulares de cada uno de los tensioactivos disponibles, con la finalidad de obtener costes más bajos con una adecuada propiedad de limpieza. De modo que, llevando en consideración estos condicionantes, el *LAS* está considerado como agente tensioactivo de primera opción dadas sus características.

Entre sus ventajas<sup>18</sup>, se puede citar:

- 1) Excelentes propiedades como tensioactivo.
- 2) Buen comportamiento ambiental, pues tanto su biodegradabilidad primaria como final son elevadas, es decir, tanto el *LAS* como sus metabolitos presentan muy alta biodegradabilidad y muy baja toxicidad.

<sup>18</sup> PETRESA Web: [www.petresa.es](http://www.petresa.es)

- 3) Compatibilidad con todo tipo de fórmulas e ingredientes. Puede ser usado en la formulación de polvos concentrados y líquidos para lavado de ropa, lavavajillas, empleando concomitantemente cualesquiera enzimas, blanqueadores y agentes complejantes.
- 4) Versatilidad de uso en todo tipo de fórmulas.
- 5) Sinergismo con otros ingredientes habituales de las formulaciones.
- 6) Muy baja relación coste/rendimiento.
- 7) Facilidad de procesado, tanto en la sulfonación con cualquier equipo o agente sulfonante, como en la elaboración del producto final en torres de atomización o en procesos de aglomeración.
- 8) Estabilidad del producto sulfonado y neutralizado sin alteración del pH con el tiempo (no hidrolizable).
- 9) Fácilmente transportable, manipulable y almacenable, ya que su forma ácida (*HLAS*) es químicamente estable, lo que no ocurre con otros tensioactivos como los AS o AES.
- 10) Compatibilidad con agentes tensioactivos para constitución de sistemas activos mixtos.

#### **4 - COMPORTAMIENTO MEDIOAMBIENTAL**

Como se ha indicado anteriormente, el *LAS* fue desarrollado debido a la

necesidad de sustituir el sulfonato de alquilbenceno ramificado, ya que esta sustancia presentaba en su estructura una zona lipofílica formada por varias cadenas de carbonos ramificadas impidiendo que los microorganismos encargados de degradar la materia orgánica pudieran actuar sobre él. Esto provocaba la existencia de problemas de acumulación de espumas que, además del impacto visual que generaban, impedían el adecuado intercambio de oxígeno entre la atmósfera y el medio acuático, produciéndose por tanto un empobrecimiento en el nivel de oxígeno y la consecuente muerte de diversas especies. Este fenómeno se puso de manifiesto a principio de la década de los 60, en el río Necker (Alemania), con concentraciones de  $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tensioactivos aniónicos.



**Figura 1.20** - Formación de espuma en un río<sup>19</sup> contaminado por el BABS

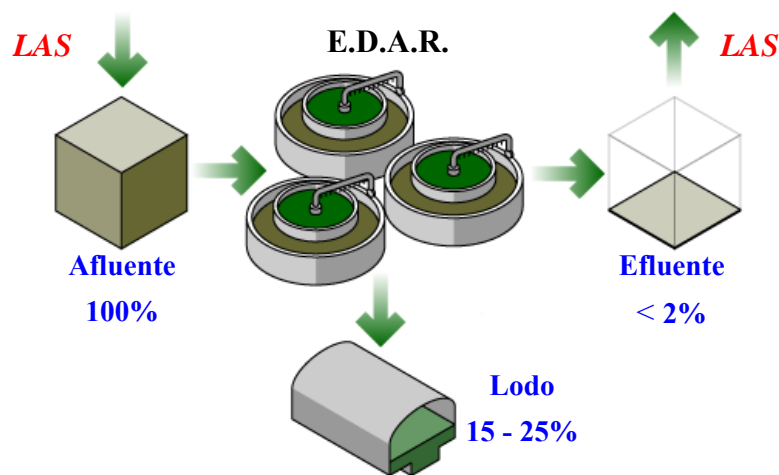
Otro problema añadido era la acumulación de espumas en plantas depuradoras que también provocaba la muerte de los microorganismos que actuaban en los lodos activados, bajo condiciones aerobias, y de este modo, disminuyese considerablemente la eficiencia de degradación de la

---

<sup>19</sup> Eichhorn P., *Surfactants and their aerobic degradation products: formation, analysis, and occurrence in the aquatic environment*. Dissertation of Doctoral Thesis. University of Mainz, Mainz, Germany, p. 5, 2001

planta depuradora.

La solución técnica al problema de las espumas llegó en la década de los 60, con la sustitución de los *BABS* por el *LAS*, lo que prácticamente hizo desaparecer las espumas debidas a esta causa. El *LAS* con su cadena alquímica lineal es fácilmente accesible a este tipo de microorganismos y por tanto es fácilmente biodegradable, de hecho el rendimiento de una planta depuradora suele ser bastante alto<sup>20, 21</sup> (98 - 99%), normalmente la concentración de *LAS* en aguas residuales<sup>22</sup> sin estar tratadas se encuentra en el rango de 1.0 - 15.0 mg·L<sup>-1</sup>, siendo el margen de concentraciones a la salida de la planta<sup>22</sup> de 0.008 - 0.22 mg·L<sup>-1</sup>. En la siguiente figura se resume el proceso<sup>21</sup> de depuración del agua residual:



**Figura 1.21** - Esquema de tratamiento del *LAS* y su eficacia

<sup>20</sup> Cavalli L., Gellera A., Lazarrin A., Nuci G.C., Tomano P., Ranzani M., Lorenzi E., *Linear alkylbenzene sulphonate removal and biodegradation in a metropolitan plant for water treatment*. Riv. Ital. Sostanze Grasse 68; 75-81, 1991

<sup>21</sup> Cavalli L., Gellera A., Landone A., *LAS removal and biodegradation in wastewater treatment plant*. Environ. Toxicol. Chem. 12; 1777-1788, 1993

<sup>22</sup> Feijtel T.C.J., van der Plassche E.J., *Environmental risk characterization of 4 major surfactants used in the Netherlands*. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Report nº 679101 025, Bilthoven, Netherlands, 1995

Los principales procesos que pueden intervenir en su transformación, hasta su desaparición de los compartimentos medioambientales, se representan en la **Tabla 1.1**.

**Tabla 1.1** - Mecanismos de eliminación del LAS del medio ambiente

Mecanismos de Eliminación	Porcentaje
Eliminación Física (Precipitación/Adsorción)	15 - 25
Eliminación Biológica (Mineralización)	75 - 85
-----	-----
Eliminación Total	> 98

El amplio uso del LAS, sea doméstico como industrial, genera una cantidad de aportes a las aguas residuales que deben ser tratadas en plantas depuradoras (EDAR) previamente a su vertido a diversos ecosistemas (afluentes, mares, ríos, lagos, etc.) o a su utilización como agua de riego.

Los lodos generados, ricos en materia orgánica, pueden ser adecuadamente tratados y desecados para obtener el compost, y de esta manera, ser utilizados como abono en las tierras de cultivo; este compost puede contener cantidades moderadas de LAS (1.0 - 15.0 mg·Kg<sup>-1</sup>). A veces, los lodos, que pueden contener cantidades superiores de LAS, se aplican directamente como enmendantes en campo y por esta razón puede ser encontrado en concentraciones relativamente altas en el medio ambiente.

A continuación se representa los destinos más comunes del LAS en el medio ambiente<sup>22</sup>:



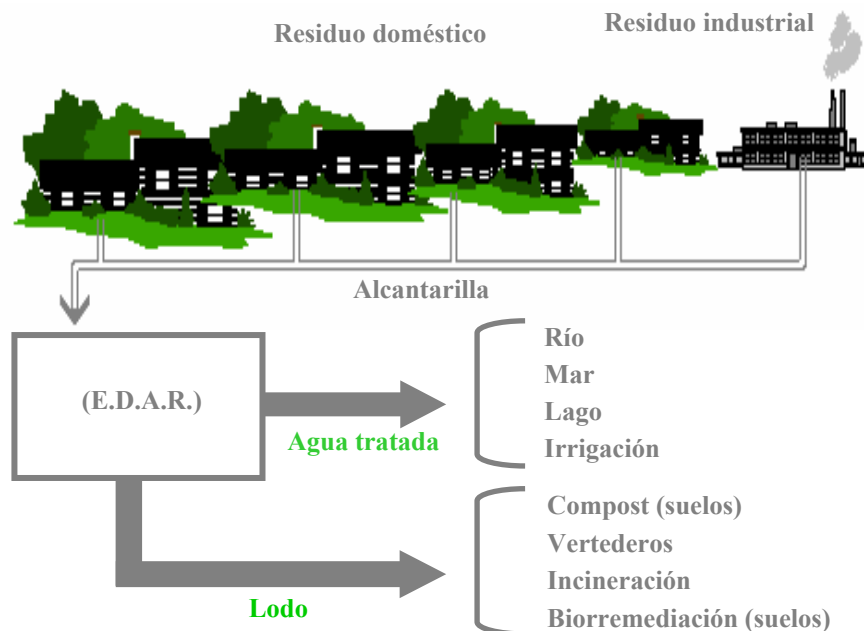


Figura 1.22 - Destinos del LAS en el medio ambiente

A continuación se recogen las concentraciones medias medidas en diversos compartimentos del medio natural:

Tabla 1.2 - Concentración de LAS en diversos compartimentos medioambientales

Compartimentos Medioambientales	Concentración de LAS total
Entrada EDAR <sup>22</sup>	1 - 15 mg·L <sup>-1</sup>
Salida planta EDAR <sup>22</sup>	8 - 220 µg·L <sup>-1</sup>
Agua de río <sup>22</sup>	< 2 - 47 µg·L <sup>-1</sup>
Agua de pozo <sup>23</sup>	0 - 3 µg·L <sup>-1</sup>

<sup>22</sup> Field J.A., Barber L.B., Thurman E.M., Moore B.L., Lawrence D.L., Peage D.A., *Fate on LAS and dialkyltetraatin sulphonates in sewage-contaminated ground waters.* Environ. Sci. Technol. 26; 1140-1146, 1992

<sup>23</sup> Field J.A., Barber L.B., Thurman E.M., Moore B.L., Lawrence D.L., Peage D.A., *Fate on LAS and dialkyltetraatin sulphonates in sewage-contaminated ground waters.* Environ. Sci. Technol. 26; 1140-1146, 1992

Tabla 1.2 - Continuación

Compartimentos Medioambientales	Concentración de LAS total
Lodos <sup>24</sup>	3.4 - 9.4 g·Kg <sup>-1</sup>
Suelos <sup>25</sup>	0.7 - 1.4 mg·Kg <sup>-1</sup>
Sedimentos de río <sup>26</sup>	< 1.0 - 5.3 mg·Kg <sup>-1</sup>

#### 4.1 - Actividad biológica del LAS

##### 4.1.1 - Actividad medioambiental

La presencia de los tensioactivos en el medio puede ocasionar diversas consecuencias a los individuos que habitan en él, por tanto un aspecto esencial es el estudio de su ecotoxicidad. Son innumerables los trabajos publicados sobre la toxicidad del LAS en distintas especies, tanto sobre microorganismos, protozoos, plancton, algas, peces, crustáceos, insectos o moluscos, como sobre plantas comunes, tomate, patatas, lechugas, y otros.

El riesgo ambiental de las sustancias químicas se estima comparando la relación entre la concentración previsible en el medio (*predicted environmental concentration - PEC*) y la concentración máxima esperada que no produzca ningún efecto (*predicted no-effect concentration - PNEC*);

<sup>24</sup> Sánchez L.J., García M.T., Tomás R., Ferrer J., Bengoechea C., *Linear Alkylbenzene Sulfonate Removal*. Tenside Surf. Det. 31; 253-256, 1994

<sup>25</sup> Mortensen G.H., Elsgaard H., Ambus P., Jensen E.S., Groen C., *Influence of plant growth on degradation of LAS in sludge-amended soil*. J. Environ. Qual. 30; 1266-1270, 2001

<sup>26</sup> Cavalli L., Cassani G., Vigano L., Pravettoni S., Nucci G., Lazzarin M., Zatta A., *Surfactants in sediments*. Tenside Surf. Det. 37; 282-288, 2000

esta relación *PEC/PNEC* debe ser siempre menor que la unidad para que el riesgo ambiental sea bajo. En el caso del *LAS* se han estudiado diferentes ecosistemas<sup>27</sup> obteniendo en todos una relación menor que la unidad, lo que indica su bajo índice de toxicidad ambiental.

**Tabla 1.3 - Relación *PEC/PNEC* en diferentes medios ambientales<sup>27</sup>**

<b>Ecosistemas</b>	<b><i>PEC</i></b>	<b><i>PNEC</i></b>	<b><i>PEC/PNEC</i></b>
Agua (mg·L <sup>-1</sup> )	0.047	0.27	0.17
Suelo (mg·Kg <sup>-1</sup> )	1.4	4.6	0.30
Sedimentos (mg·Kg <sup>-1</sup> )	5.3	8.1	0.65
EDAR (mg·L <sup>-1</sup> )	0.14	3.5	0.04

Se han descrito diversos efectos que los tensioactivos pueden causar sobre las membranas celulares y proteínas debido a la actividad superficial que presentan<sup>28</sup>. Como consecuencia de estos efectos, pueden ser inhibidores de bacterias<sup>29</sup>, hongos y otros habitantes del ecosistema del suelo<sup>30, 31, 32</sup>, por esta razón la exposición del suelo de cultivo a estos compuestos puede alterar su actividad biológica, acción que es muy importante para la

<sup>27</sup> HERA Risk assessment of LAS, version nº 9, July 2002

<sup>28</sup> Schwuger M.J., Bartnik F.G., *Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranes*. In Gloxhuber C. Ed, *Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology*. Marcel Dekker, New York, USA, pp 1-49, 1980

<sup>29</sup> Hartmann L., *Effect of surfactants on soil bacteria*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1; 219-224, 1996

<sup>30</sup> Holmstrup M., Krogh P.H., *Effects of an anionic surfactant, linear alkylbenzene sulfonate, on survival, reproduction and growth of the soil-living collembolan Folsomia fimetaria*. Environ. Toxicol. Chem. 15; 1745-1748, 1996

<sup>31</sup> Wilke B., *Effects of non-pesticide organic pollutants on soil microbial activity*. Adv. GeoEcol. 30; 117-132, 1996

<sup>32</sup> Jensen J., *Fate and effects of LAS in the terrestrial environment*. Sci. Tot. Environ. 226; 93-111, 1999

calidad del suelo y del ciclo nutricional<sup>33</sup>, además pueden inhibir notablemente bacterias reductoras de hierro y afectar tanto a bacterias Gram-negativo como Gram-positivo<sup>34</sup>.

En el caso particular del LAS, cabe destacar que la toxicidad de los homólogos e isómeros que conforman la mezcla comercial es diferente en cada especie, así se puede afirmar que a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica lineal, aumenta la toxicidad del compuesto<sup>35</sup>.

#### 4.1.2 - Salud humana

Para evaluar el riesgo de intoxicación de un cierto compuesto como consecuencia de su absorción por el organismo humano, existe un parámetro denominado *MOE* (*Margin of Exposure* - Margen de Exposición), que se define como la relación entre *NOAEL* (*No Observed Adverse Effect Level*, un indicador de los efectos tóxicos de una sustancia en seres vivos y su significado es la máxima dosis/concentración de exposición experimental probada, al cual no se observan efectos tóxicos, es decir, el máximo nivel sin efecto adverso observado), o cualquier otro indicador de efectos tóxicos, con la tasa de exposición humana a la sustancia en estudio. Se considera que un valor de más de 100 es un margen suficiente para tener en cuenta la posible variabilidad e incertidumbre de

---

<sup>33</sup> Turco R.F., Kennedy A.C., Jawson M.D., *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Society of America (Special Edition 35), Madison, USA, p. 73-90, 1994

<sup>34</sup> Elsgaard L., Petersen S.O., Deboz K., Kristiansen I.B., *Effects of LAS on soil microbiology*. Tenside Surf. Det., 38; 2, 94-97, 2001

<sup>35</sup> BKH Consulting Engineers, *The use of existing data for estimation of the maximum tolerable environmental concentration of LAS*. Part I: main report. Part II: data list, BKH, Deft, Netherlands, 1993

los datos de contaminación y considerar que la sustancia no provoca efectos adversos hacia el organismo. El *NOAEL* ha sido estimado para el caso del *LAS* en  $85 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal<sup>36</sup> considerando que, de los numerosos estudios realizados, es el valor que más se aproxima al *LOAEL* más bajo que se ha determinado:  $115 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal<sup>36</sup> (*Lowest Observed Adverse Effect Level*, el nivel más bajo con efecto adverso observado). Por tanto el *NOAEL* estimado se refiere a la dosis que no produce efectos sobre parámetros bioquímicos renales que han sido estudiados durante un periodo de 9 meses mediante administración oral de dosis variables *LAS* a ratas. También se llevó en consideración que la biodisponibilidad oral del *LAS* fue estimada en el 80%<sup>36</sup>, y que la absorción es vía mayoritariamente gastrointestinal. Teniendo en cuenta esto, el valor sistemático del *NOAEL* se consideró como de  $68 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de peso corporal al día<sup>36</sup>.

En el caso del *LAS*, debido a su extendido uso doméstico, hace que el riesgo de exposición a piel, ojos, mucosas, etc. pueda ser elevado. La concentración a la que se encuentra el *LAS* en estas formulaciones varía entre un 1% y un 50%. Aunque el *LAS* puro es irritante para ojos y piel, dependiendo de la concentración, las disoluciones pueden o no poseer carácter irritante. Disoluciones con una concentración superior al 65% se consideran “tóxicas por ingestión”<sup>37</sup> (código de descripción del riesgo R22). Los diferentes tipos de contacto con el organismo humano pueden ser:

- a) Contacto directo o indirecto con la piel: Se deben tener en cuenta

---

<sup>36</sup> HERA (Human and Environmental Risk Assessment of LAS), version 2.0, May 2004

<sup>37</sup> CESIO, Statistics, Brussels, 2000

los hábitos de limpieza<sup>38</sup> que comúnmente existen en la zona de Europa Occidental. El *LAS* se puede encontrar en diferentes tipos de formulaciones y concentraciones para diferentes tipos de aplicaciones: para formulaciones de lavado de ropa se estima que el contacto con este tipo de productos es de unos 10 minutos por lavado y que la absorción de tensioactivos aniónicos vía cutánea es bastante baja<sup>39</sup> (aproximadamente del 1% en los casos más graves), las disoluciones empleadas para el lavado contienen como máximo una concentración de *LAS* de 2.2 g·L<sup>-1</sup>, la superficie de exposición que ofrecen las manos y antebrazos se considera que es de unos 1980 cm<sup>2</sup> y que la película de disolución de detergente que permanece en contacto con la piel tiene un espesor de 100 μm (0.01 cm) y permanece en contacto 24 horas en el peor de los casos. Con estas premisas se puede estimar la cantidad de *LAS* absorbido:

$$\text{Cantidad diaria de } \underline{\text{LAS absorbido}} = 1980 \text{ cm}^2 \cdot 0.01 \text{ cm} \cdot 0.01 \text{ (fracción absorbida)} \cdot 2.2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3} = 0.44 \text{ mg } \text{LAS} \text{ absorbido en 24 horas.}$$

Si el tiempo de exposición generalmente es de unos 10 minutos por lavado, y esta operación se realiza unas tres veces al día y que se considera un peso corporal en el peor de los casos de 60 kg, se puede calcular una tasa de absorción por la piel de 0.15 μg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal al día. Con este dato, se puede evaluar el valor del *MOE*<sup>36</sup> resultando ser de 453000.

Aplicando la misma metodología para calcular la exposición humana al *LAS*, de manera similar, se han evaluado otras vías de contacto directo con la piel debido a otros tipos de lavados. Los resultados obtenidos son los que

---

<sup>38</sup> AISE, Table of Habits and Practices for Consumer Products in Western Europe, 2002

<sup>39</sup> Schaefer H., Redelmeier T.E., *Skin barrier. Principles of percutaneous absorption*. S Karger AG, ISBN 3-8055-6326-4, P.O. Box, CH-4009, Basel, Switzerland, 1996

a continuación se recogen:

**Tabla 1.4 - Formas de contacto directo de LAS con la piel**

<b>Modo de exposición</b>	<b>Tasa de absorción (<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math> de peso corporal/día)</b>	<b>Margen de Exposición<sup>36</sup> (MOE)</b>
Pretratamiento de ropa	1.4	$4.86\cdot 10^4$
Lavado de vajillas	0.09	$7.56\cdot 10^5$
Residuos del lavado	0.7	$9.70\cdot 10^4$

b) Inhalación provocada por el uso de aerosoles: Otra posible vía de contacto directo del LAS con el organismo es por inhalación. En la siguiente tabla se recogen las distintas formas en las que se puede inhalar LAS cotidianamente. Para realizar estos cálculos se ha asumido el caso extremo de una absorción total del LAS disponible en suspensión. A continuación se exponen los valores calculados:

**Tabla 1.5 - Formas de contacto directo de LAS por inhalación**

<b>Modo de exposición</b>	<b>Tasa de absorción (<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math> de peso corporal/día)</b>	<b>Margen de Exposición<sup>36</sup> (MOE)</b>
Inhalación de polvo de detergente	0.003	$> 10^7$
Aerosoles de productos de limpieza	0.06	$1.10\cdot 10^6$

c) Ingestión debida a depósitos que puedan existir en platos, ingestión accidental, etc.: Por último, la tercera vía de exposición que se considera es la oral. En la siguiente tabla se recogen los resultados calculados para este tipo de exposición:

*Tabla 1.6 - Formas de contacto directo de LAS por ingestión*

<b>Modo de exposición</b>	<b>Tasa de absorción (<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math> de peso corporal/día)</b>	<b>Margen de Exposición<sup>36</sup> (MOE)</b>
Ingestión de agua potable	0.1	$6.80\cdot 10^5$
Restos de LAS en utensilios de cocina	1.5	$4.50\cdot 10^4$

Si se considera la suma de todas las posibles fuentes de exposición que se tienen en cuenta en este estudio, resulta que la tasa total es de:  $0.15 + 1.40 + 0.09 + 0.70 + 0.06 + 0.10 + 1.50 = 4.00 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  por día, de donde se puede deducir que el margen de exposición total es de 17000. Este margen es suficientemente alto como para considerar un nivel de confianza aceptable en la utilización doméstica de LAS.

#### **4.2 - Biodegradabilidad**

Se entiende por biodegradación la ruptura molecular de un sustrato orgánico, resultante de la acción enzimática de microorganismos vivos que utilizan este sustrato como alimento. La problemática medioambiental surgida en la biodegradación de moléculas complejas, determinó la importancia de la distinción de diferentes tipos de biodegradabilidad, cuyo concepto está incorporado en la legislación vigente. Así, se distingue entre:

**a) Biodegradación primaria** se refiere a la que ocurre en el sustrato que permite la pérdida de las propiedades características de la molécula intacta. En el caso de los tensioactivos, está relacionada con la pérdida de su capacidad para formar espuma o con la reducción de la tensión superficial.



**b) Biodegradabilidad avanzada** se alcanza cuando la molécula de sustrato se divide en segmentos más pequeños.

**c) Biodegradación final, última o mineralización**, es la que, a través de una secuencia de ataques enzimáticos, reduce el sustrato a la estructura más simple posible. Bajo este término se engloban todos aquellos procesos realizados por agentes microbiológicos medioambientales que convierten la materia orgánica compleja en compuestos más simples que pueden ser utilizados como nutrientes y generar energía además de ser transformados en material inorgánico después de sufrir diferentes procesos químicos.

Cabe destacar que estos procesos se pueden llevar a cabo bajo diferentes niveles ambientales de oxígeno:

- *Condiciones aerobias*, donde el flujo de oxígeno excede a la demanda de este gas que la actividad bacteriológica pueda requerir.
- *Condiciones anaerobias*, donde se pueden distinguir a su vez dos tipos de situaciones:
  - aquellas donde la velocidad de consumo de oxígeno excede a la velocidad de difusión (*condiciones anóxicas*).
  - aquellas donde el oxígeno es totalmente excluido (*condiciones estrictamente anaerobias*).

Desde su introducción en el mercado, hace más de 40 años, hay una extensiva base de datos referente a la biodegradación del *LAS* en

condiciones aeróbicas. Buena parte de estos datos son ensayos de laboratorio estandarizados por la *OECD* usados de modo rutinario en Europa y América del Norte con la finalidad de determinar el potencial de biodegradación de las sustancias orgánicas (*OECD*<sup>40</sup>, 1993). Para verificar la mineralización de estas sustancias fueron estipulados algunos parámetros no específicos: consumo de O<sub>2</sub>, remoción de carbón orgánico y formación de CO<sub>2</sub> (Fischer<sup>41</sup> *et al.*, 1975; Gerike & Fischer<sup>42</sup>, 1979; Gerike<sup>43</sup> *et al.*, 1980; Larson<sup>44</sup>, 1979; Peceník<sup>45</sup> *et al.*, 1984). Sin embargo había dos factores principales que limitaban la extrapolación de estos estudios en relación a sus respectivos comportamientos reales (en el medioambiente): los ensayos no simulaban las condiciones físicas, químicas y biológicas encontradas en los compartimentos ambientales; los ensayos ignoraban algunos compartimentos como sedimentos, suelos, aguas de pozo, estuarios y océanos, que pueden tener gran importancia en la biodegradación de los tensioactivos.

Para superar estas limitaciones, algunos trabajos científicos fueron realizados simulando las condiciones ambientales, empleando para tal finalidad, la creación de un microcosmos tanto en el campo como en el laboratorio. Estos estudios fueron realizados en diversas matrices

---

<sup>40</sup> OECD (Organization of Economic and Cooperation and Development), *Guidelines for the testing of chemicals*. Paris, France, 1993

<sup>41</sup> Fischer W.K., Gerike P., Holtmann W., *Biodegradation determinations via unspecific analyses (COD DOC) in coupled units of the OECD confirmatory test. The Test*. Water Res. 9; 1131-1135, 1975

<sup>42</sup> Gerike P., Fischer W.K., *A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests*. Ecotoxicol. Environ. Safety 3; 157-173, 1979

<sup>43</sup> Gerike P., Fischer W.K., Holtmann W., *Biodegradation determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test*. Water Res. 14; 753-758, 1980

<sup>44</sup> Larson R.J., *Evaluation of biodegradation potencial of xenobiotic organic chemicals*. Appl. Environ. Microbiol. 38; 1153-1161, 1979

<sup>45</sup> Peceník G., Borgovoni G., Castro P., Gagliardi I., *Biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates (LAS)*. Presented in 1<sup>o</sup> World Surfactant Congress 1; 121-127, 1984

medioambientales, tales como: sedimentos (Federle & Schwab<sup>46</sup>, 1992; Larson<sup>47</sup> *et al.*, 1993), suelos (Branner<sup>48</sup> *et al.*, 1999; Finge & Schöberl<sup>49</sup>, 1989; Litz<sup>50</sup> *et al.*, 1987), agua de pozo (Krueger<sup>51</sup> *et al.*, 1998; Larson<sup>52</sup> *et al.*, 1989), aguas superficiales (Perales<sup>53</sup> *et al.*, 1999; Schöberl<sup>54</sup> *et al.*, 1998), aguas de estuarios (Shimp<sup>55</sup>, 1989; Terzic<sup>56</sup> *et al.*, 1992) y agua de mar (Quiroga<sup>57</sup> *et al.*, 1999; Quiroga & Sales<sup>58</sup>, 1990; Sales<sup>59</sup> *et al.*, 1987; Vives-Rego<sup>60</sup> *et al.*, 2000). En la mayoría de estos estudios se observó una degradación primaria del LAS, dependiente entre otras cosas del historial

<sup>46</sup> Federle T.W., Schwab B.S., *Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond*. Water Res. 26; 123-127, 1992

<sup>47</sup> Larson R.J., Rothgeb T.M., Shimp R.J., Ward T.E., Ventullo R.M., *Kinetics and practical significance of biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate in the environment*. J. Am. Oil. Chem. Soc. 70; 645-657, 1993

<sup>48</sup> Branner U., Mygind M., Jorgensen C., *Degradation of linear alkylbenzene sulfonate in soil columns*. Environ. Toxicol. Chem. 18; 1772-1778, 1999

<sup>49</sup> Figge K., Schöberl P., *LAS and the application of sewage sludge in agriculture*. Tenside Surf. Det. 26; 122-138, 1989

<sup>50</sup> Litz N., Doering H.W., Thiele M., Blume H.-P., *The behavior of LAS in different soils: a composition between field and laboratory studies*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 14; 103-116, 1987

<sup>51</sup> Krueger C.J., Barber L.B., Metge D.W., Field J.A., *Fate and transport of LAS in a sewage-contaminated aquifer: a comparison of natural-gradient pulsed tracer tests*. Environ. Sci. Technol. 32; 1134-1142, 1998

<sup>52</sup> Larson R.J., Federle T.W., Shimp R.J., Ventullo R.M., *Behavior of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater*. Tenside Surf. Det. 26; 116-121, 1989

<sup>53</sup> Perales J.A., Manzano M.A., Sales D., Quiroga J.M., *Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulfonate in river water*. Int. Biodeter. Biodegr. 43; 155-160, 1999

<sup>54</sup> Schöberl P., Guhl W., Scholz N., Taeger K., *Simulation method for determining biodegradation in surface waters*. Tenside Surf. Det. 35; 279-285, 1998

<sup>55</sup> Shimp R.J., *Linear alkylbenzene sulfonate biodegradation in estuaries*. Tenside Surf. Det. 26; 390-393, 1989

<sup>56</sup> Terzic S., Hrsax D., Ahel M., *Primary biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in estuarine waters*. Water Res. 26; 585-591, 1992

<sup>57</sup> Quiroga J.M., Perales J.A., Romero L.I., Sales D., *Biodegradation kinetics of surfactants in seawater*. Chemosphere 39; 1957-1969, 1999

<sup>58</sup> Quiroga J.M., Sales D., *Experimental variables in biodegradation kinetics of surfactants in marine environment*. Bull. Environ. Contam. 44; 851-858, 1990

<sup>59</sup> Sales D., Quiroga J.M., Gómez-Parra A., *Primary degradation kinetics of anionic surfactants in marine environment*. Bull. Environ. Contam. 39; 385-392, 1987

<sup>60</sup> Vives-Rego J., López R., Guindulain T., García M.T., Comas J., Sánchez-Leal, *Microbial aspects of LAS degradation in coastal water*. J. Surf. Det. 3; 303-308, 2000

de exposición de la matriz con esta sustancia. Así, en un compartimiento medioambiental con una continua exposición a residuos de *LAS*, como pueden ser algunas áreas costeras con descarga directa de residuos domésticos, su biodegradación era más efectiva ya que la microbiota local ya se encontraba adaptada al sustrato.

Una descripción más detallada de la degradación aeróbica del *LAS* fue realizada por Swisher<sup>61</sup> (1987) y Schöberl<sup>62</sup> (1989). La mayoría de los estudios realizados en laboratorio indican que el proceso de biodegradación se inicia con la oxigenación de un grupo metilo terminal de la cadena alquílica, y la conversión del alcohol a un grupo carboxílico ( $\omega$ -oxidación), originando los sulfonil carboxilatos (*SPCs*, del inglés *Sulfo Phenyl Carboxylic Acids*) como intermediarios de biodegradación<sup>61</sup>. Estos compuestos intermedios poseen una toxicidad mucho menor que la molécula madre, además de que no tienen propiedades deterativas.

La tasa de degradación de los componentes individuales de una mezcla comercial del *LAS* (homólogos e isómeros) dependerá de su estructura molecular, ya que: a) la longitud de la cadena alquílica está directamente relacionada con la tasa de degradación primaria (a mayor longitud, más rápido se degrada); b) los fenilo-isómeros localizados en las posiciones centrales son degradados más lentamente que los isómeros situados en las extremidades (Setzkorn<sup>63</sup> *et al.*, 1964; Swisher<sup>64</sup>, 1963).

---

<sup>61</sup> Swisher R.D., *Surfactants biodegradation*, 2º Ed. Marcell Dekker, New York, USA, 1987

<sup>62</sup> Schöberl P., *Basic principles of LAS biodegradation*. Tenside Surf. Det. 26; 86-94, 1989

<sup>63</sup> Setzkorn E.A., Huddleston R.L., Allred R.C., *An evaluation of the river die-away technique for studying detergent biodegradation*. J. Am. Oil. Chem Soc. 41; 826-830, 1964

Ambos efectos son una consecuencia directa del ataque enzimático a la cadena alquílica de la molécula del LAS. La relación entre la estructura molecular del tensioactivo y su biodegradación es conocida y llamada como “Principio de la distancia de Swisher<sup>61</sup>”, de forma que, de un modo general, se puede decir que la velocidad de degradación aumenta cuando se incrementa la distancia del grupo metilo terminal al lugar donde se acopla el grupo sulfonilo, o cuando se incrementa la longitud de la cadena alquílica (por ejemplo, el isómero 2ØC<sub>12</sub>-LAS se degrada más rápidamente que el 6ØC<sub>12</sub>-LAS, y éste a su vez más rápidamente que el 6ØC<sub>11</sub>-LAS).

Subsecuentemente a la ω-oxidación, ocurren sucesivas etapas de oxidación que van promoviendo la fragmentación de la cadena alquílica eliminando 2 carbonos a la vez, llamadas de β-oxidación (Huddleston & Allred<sup>65</sup>, 1963; Swisher<sup>66</sup>, 1963), hasta que esta cadena se quede muy corta. Con el resultado de un SPC de cadena muy corta, puede ocurrir, la ruptura del anillo bencénico, siendo ésta considerada la etapa limitante de todo el proceso de degradación. El mecanismo más aceptado responsable por esta ruptura es por formación del 4-sulfocatecol (Schulz<sup>67</sup> *et al.*, 2000) ya que muchos microorganismos que degradan el LAS presentan altos niveles de la enzima 4-sulfocatecol 1,2 dioxigenasa (Dong<sup>68</sup> *et al.*, 2004).

---

<sup>64</sup> Swisher R.D., *Biodegradation of ABS in relation to chemical structure*. J. Water Poll. Control Fed. 35; 877-892, 1963

<sup>65</sup> Huddleston R.L., Allred R.C., *Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes*. Dev. Ind. Microbiol. 4; 24-38, 1963

<sup>66</sup> Swisher R.D., *Transient intermediates in the biodegradation of LAS*. J. Water Poll. Control Fed. 35; 1557-1564, 1963

<sup>67</sup> Schulz S., Dong W., Groth U., Cook A.M., *Enantiomeric degradation of 2-(4-sulfophenyl)butyrate via 4-sulfocatechol in *Delfia acidovorans* SPB 1*. Appl. Environ. Microbiol. 66; 1905-1910, 2000

<sup>68</sup> Dong W., Radajewski S., Eichhorn P., Denger K., Knepper T.P., Murrell J.C., Cook A.M., **Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, β-unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities*. Appl. Environ. Microbiol. 96; 630-640, 2004

Aunque la  $\beta$ -oxidación es la principal vía de destrucción de la cadena alquílica del LAS, también puede ocurrir la remoción de carbonos a través de la  $\alpha$ -oxidación, pero esta posibilidad ocurre en menor grado. Esta ruta alternativa fue postulada para intentar explicar el hallazgo del C<sub>5</sub>-SPC como producto de degradación del C<sub>12</sub>-LAS (Baggi<sup>69</sup> *et al.*, 1974) y la detección de una amplia variedad de SPCs, tanto con cadena alquílica con número de carbonos impares y pares, como intermediarios durante la degradación del C<sub>11</sub>-LAS (Eggert<sup>70</sup> *et al.*, 1979).

La biodegradación completa del LAS concluye con la desulfonación de la molécula con total mineralización del compuesto en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y la incorporación de estas sustancias a la biomasa del ecosistema<sup>71, 72</sup>. Una de las evidencias de que la cadena alquílica y parte del anillo aromático pertenecientes a la molécula del LAS puede biodegradarse en el medioambiente y convertirse en CO<sub>2</sub> fue presentada en un estudio que simulaba una estación de tratamiento de aguas residuales donde el LAS comercial empleado poseía carbonos marcados isotópicamente (<sup>14</sup>C) en el anillo aromático (Nielsen & Huddleston<sup>73</sup>, 1981). En un estudio realizado anteriormente ya se había evidenciado qué partes de la molécula del LAS

---

<sup>69</sup> Baggi G., Catelani D., Colombi A., Galli E., Treccani V., *The microbial degradation of phenylalkanes: 1- and 2-phenyldodecane, 2- and 3-phenyldodecane-p-sulfonates*. Ann. Microbiol. Enzimol. 24; 317-323, 1974

<sup>70</sup> Eggert C.R., Kaley R.G., Gledhill W.E., *Application of a laboratory freshwater lake model in the study of LAS biodegradation in: Proc. of the Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments*, Bourquin AW, Eds. Pritchard PH, U.S. EPA Report 600/9-79-012, Bourquin, USA, pp. 451-461, 1979

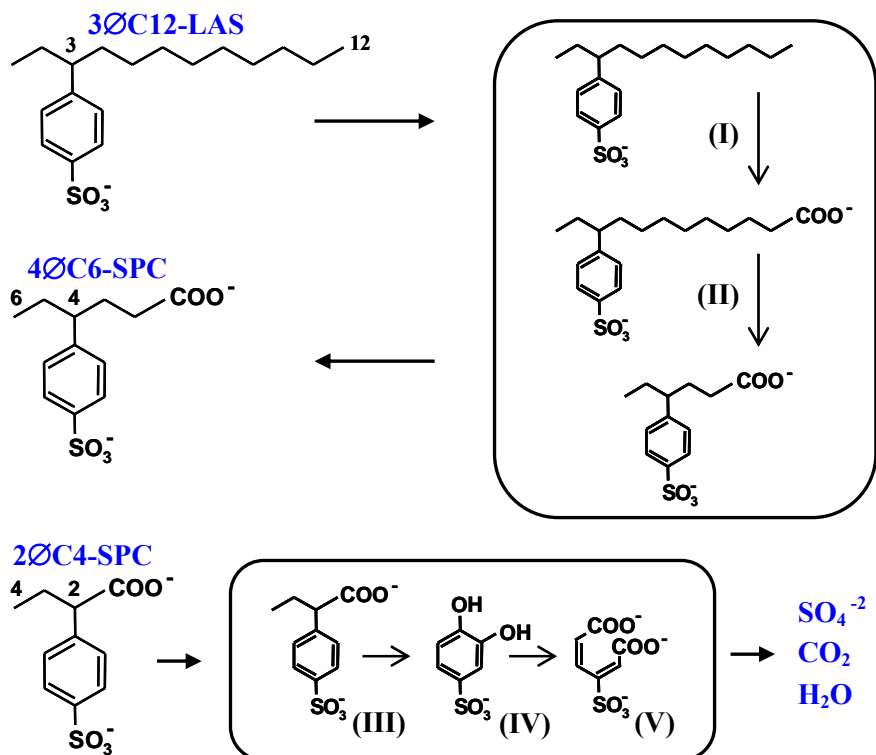
<sup>71</sup> Heinze J.E., Britton L.N., *Anaerobic Degradation: Environmental Relevance*. 3<sup>o</sup> World Conference on Detergent. A. Cahn, AOCS, Champaign, USA, pp. 235-239, 1994

<sup>72</sup> Karsaand D.M. Porter M.R., *Biodegradability of surfactants*, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK, 1995

<sup>73</sup> Nielsen A.M., Huddleston R.L., *Ultimate biodegradation of LAS alkyl and ring carbon*. Dev. Ind. Microbiol. 22; 415-424, 1981

se podrían convertir en  $\text{CO}_2$ , también mediante el empleo del grupo fenilo marcado isotópicamente ( $^{14}\text{C}$ )<sup>74</sup>.

En el siguiente esquema se presenta de manera resumida el proceso de biodegradación aeróbica:



**Figura 1.23** - Proceso de biodegradación aeróbica del LAS, donde se puede observar una posible ruta de degradación. Para que esto ocurra es necesario distintas etapas y/o reacciones como: (I)  $\omega$ -oxidación; (II)  $\beta$ -oxidación; (III) remoción de la cadena alquílica con dioxigenación formando el 4-sulfocatecol; (IV) apertura del anillo bencénico; (V) desulfonación

También existen estudios donde se obtienen velocidades de biodegradación

<sup>74</sup> Gledhil W.E., *Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonates*. Appl. Microbiol. 30; 922-929, 1975

en diferentes ecosistemas comprendidas entre 1 y 12 h ( $t_{1/2}$ ), con unas constantes de velocidad de degradación en condiciones reales entre  $k = 0.06$  y  $0.7 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente<sup>75</sup>. Estos procesos son los que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento de aguas residuales y en condiciones aerobias. En estas plantas se considera que el rendimiento de eliminación del LAS es de un 99.2%, del cual el 75 - 85% es debida a la biodegradación real del producto, alrededor del 1% es liberado al agua y un 15 - 25% es acumulado por los lodos<sup>21</sup>.

En condiciones donde el oxígeno es limitante la biodegradación del LAS se produce mediante otro tipo de mecanismos que no se conocen en profundidad. Bajo estas condiciones estos procesos se dan con mayor dificultad. Cabe distinguir entre dos condiciones diferentes:

- *Condiciones anaerobias estrictas*, donde se muestra que el LAS después de 40 días no muestra una biodegradación significativa<sup>76</sup>. Sin embargo, estas condiciones tan estrictas no se encuentran normalmente en la naturaleza.
- Las condiciones anaerobias más comunes en la naturaleza son las definidas como *Condiciones anóxicas*, que pueden ser definidas como aquellas en las cuales la velocidad de consumo de oxígeno por microorganismos excede a la velocidad de difusión, en estas condiciones la cantidad de oxígeno esta limitada, pero no excluida totalmente del medio. El LAS puede iniciar su biodegradación en

---

<sup>75</sup> Fox K.K., Holt M.S., Daniel M., Bukland H., Guymer I., *Removal of LAS from a small Yorkshire stream*. Contribution to GREAT-ER Project, Sci. Total. Environ. 251; 265-275, 2000

<sup>76</sup> AISE/CESIO, *Anaerobic biodegradation. Review of scientific information*, Brussels, Belgium, 1999



condiciones aerobias y continuar en condiciones anaerobias<sup>77, 78</sup>.

#### 4.2.1 - Modelos matemáticos

El empleo de modelos matemáticos que intentan explicar la degradación de los compuestos químicos en matrices medioambientales como el suelo ha sido una herramienta ampliamente utilizada.

El modelo lineal (monofásico o cinética de un compartimiento) basado en la ecuación exponencial de primer orden, es uno de los más empleados (Krueger<sup>79</sup> *et al.*, 1998; Larson<sup>80</sup> *et al.*, 1989).

Cuando la degradación no se ajusta a una cinética de primer orden, puede seguir un modelo bifásico (Romero<sup>81</sup> *et al.*, 1998; Madsen<sup>82</sup> *et al.*, 1999; Beulke & Brown<sup>83</sup>, 2001). Existen varias ecuaciones empíricas no lineales

---

<sup>77</sup> León V.M., González-Mazo E., Forja J.M., *Vertical distribution profiles of linear alkylbenzene sulfonate and their long-chain intermediate degradation products on coastal marine sediments*. *Env. Toxicol. Chem.* 20; 2171-2178, 2001

<sup>78</sup> Prats D., Rodríguez D., Llamas J.M., Muela M.A., Ferrer J., Moreno A., Berna J.L., *The use of specific analytical methods to assess the anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate*. 5<sup>th</sup> World CESIO Congress. Firenze, Italy, V.2; pp. 1655-1658, 2000

<sup>79</sup> Krueger C.J., Radakovich K.M., Sawyer T.E., Barber L.B., Smith R.L., Field J.A., 1998. *Biodegradation of the surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage contaminated groundwater: A comparison of column experiments and field tracer tests*. *Environ. Sci. Technol.* 32; 3954-3961, 1998

<sup>80</sup> Larson R.J., Federle T.W., Shimp R.J., Ventullo R.M., *Behaviour of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater*. *Tenside Surf. Det.* 26; 116-121, 1989

<sup>81</sup> Romero E., Dios G., Mingornace M.D., Matallo M.B., Peña A., Sánchez-Rasero F., *Photodegradation of mecoprop and dichlorprop on dry moist and amended soil surfaces exposed to sunlight*. *Chemosphere* 37; 577-589, 1998

<sup>82</sup> Madsen P.L., Thyme J.B., Henriksen K., Møldrup P., Roslev P., *Kinetics of di-(2-ethylhexyl)phthalate mineralization in sludge-amended soil*. *Environ. Sci. Technol.* 33; 2601-2606, 1999

<sup>83</sup> Beulke S., Brown C.D., *Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling*. *Biol. Fertil. Soils* 33; 558-564, 2001

que describen el modelo de degradación bifásico, como puede ser el modelo de compartimiento protegido (*“Protected Compartment Model”*), el modelo bioexponencial o la ecuación de Hoerl.

El objeto de la cinética química es medir las velocidades de las reacciones químicas, definiendo esta última como la variación con el tiempo de la concentración de una de las sustancias, reactivos o productos que toman parte en la misma.

Para el reactivo  $X$  ( $LAS$ ) su velocidad de desaparición, supuesta una cinética de primer orden, puede expresarse como:

$$-\frac{d[X]}{dt} = k[X] \quad (1.1)$$

Integrando, resulta la ecuación (1.2):

$$[X] = [X_0] \cdot e^{-kt} \quad (1.2)$$

donde  $X_0$  es la concentración inicial de  $LAS$  y  $k$  la constante de velocidad del proceso y  $t$  el tiempo de degradación. También puede ser expresada a través de una ecuación lineal (1.3). De esta forma, se permite calcular el valor de las constantes de degradación y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), dado por (1.4).

$$\ln [X] = \ln [X_0] - kt \quad (1.3)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1.4)$$

Sin embargo, en la evaluación del comportamiento de sustancias químicas en sistemas medioambientales, los compuestos que más comúnmente son estudiados por la mayoría de los modelos desarrollados actualmente hacen referencias, indudablemente, a los pesticidas debido a su extensa utilización en la agricultura. Es por esto que gran parte de las publicaciones científicas se centran en la utilización de estos recursos buscando evidenciar el comportamiento de estas especies químicas.

Para esta finalidad se han aplicado modelos matemáticos más complejos Cohen<sup>84</sup> *et al.*, 1995; Klein<sup>85, 86</sup> *et al.*, 1997 y 2000). Destaca el modelo denominado FOCUSPELMO 1.1.1 (o PELMO 3.2), basado en el modelo PELMO, que es un modelo compartimental de simulación del movimiento de sustancias químicas en el suelo, en la zona no saturada<sup>84</sup>. Este modelo considera la existencia de movimientos de convección y dispersión del soluto<sup>84</sup>. Desde la primera versión (PELMO 2.01), se han realizado varias mejoras entre las que se contempla la posibilidad de formación de CO<sub>2</sub> en el proceso de degradación de los metabolitos (PELMO 3.0 → Jene<sup>87</sup>, 1998).

La validación se ha realizado con resultados obtenidos con lisímetros

---

<sup>84</sup> Cohen S.Z., Wauchope R.D., Klein A.W., Eadsforth C.V., Graney R., *Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticide leaching and runoff*. Pure Appl. Chem. 67, 2109-2148, 1995

<sup>85</sup> Klein M., Müller M., Dust M., Görlitz G., Gottesbüren B., Hassink J., Kloskowski R., Kubiak R., Ressler H., Schäfer H., Sterin B., Vereecken H., *Validation of the pesticide leaching model PELMO using lysimeter studies performed for registration*. Chemosphere 35; 2563-2587, 1997

<sup>86</sup> Klein M., Hosang J., Schäfer H., Erzgräber B., Ressler H., *Comparing and evaluating pesticide leaching models - Results of simulations with PELMO*. Agric. Water Manage. 44; 263-281, 2000

<sup>87</sup> Jene B., *PELMO 3.00, Manual Extensión. SLFA Neustadt, Ecology Department, Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt, Alemania, 1998*

(Fent<sup>88</sup> *et al.*, 1998), y recientemente se ha introducido la posibilidad de la utilización de escenarios FOCUS o la creación de un escenario específico (FOCUSPELMO 1.1.1<sup>87</sup>; FOCUS 2000<sup>89</sup>).

También se puede mencionar el modelo HERSIM, usado para calcular la desaparición de herbicidas en función del tiempo, considerando fenómenos como la adsorción, la actividad microbiana y el efecto de la temperatura.

De modo genérico, fundamentalmente, estos modelos llevan en consideración algunos parámetros como: **a)** parámetros climatológicos (tasa de evaporación, precipitación diaria, temperatura media diaria, humedad relativa del aire); **b)** parámetros de la sustancia química relacionado con su adsorción o a su transporte en el suelo ( $K_{oc}$ ,  $K_d$  o  $K_f$ , exponente de Freundlich -  $1/n$ ); **c)** parámetros de la sustancia química relacionado con su degradación (constante de degradación considerada en una cinética de primer orden); **d)** parámetros referentes al suelo (densidad real del suelo, contenido en carbono orgánico, descripción de la textura del suelo); **e)** parámetros relacionados con la aplicación de la sustancia al suelo (dosis, tipo y profundidad de aplicación); entre otros factores.

## 5 - LEGISLACIÓN

La evolución legislativa sobre los tensioactivos va íntimamente unida a la problemática que surge como consecuencia de su consumo y, entre otros,

---

<sup>88</sup> Fent G., Jene B., Kubiak R., Performance of the Pesticide Leaching Model PELMO 2.01 to predict the leaching of bromide and <sup>14</sup>C-benazolin in a sandy soil in comparison to results of a lysimeter - and field study. *Staatliche Lehr - und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA)*, Neustadt, Poster Abstract 6B-030, IUPAC Congress Book of Abstracts, London, 1998

<sup>89</sup> FOCUS, *FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances*. Documento de FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup, EC. Sanco/321/200 rev, p. 202, 2000

está muy influenciada por dos hechos medioambientales fundamentales: la aparición tanto de espumas persistentes como de metabolitos de elevada toxicidad. Así, desde que en Alemania se fabricó el primer detergente sintético, la industria fomentó la producción de este tipo de compuestos rebajando costes para introducirlos en un mercado cada vez con mayor demanda y más competitivo. Su uso creciente en formulaciones comerciales determinó que en la década de los 50 comenzaran a surgir problemas ambientales de contaminación por la aparición de espumas en ríos, depuradoras y en aguas subterráneas. Pronto se comprobaría, mediante la realización de diferentes estudios, que la causa era la utilización creciente de los tensioactivos “duros” (*BABS*) y, posteriormente, se solucionaría este problema con su sustitución por el *LAS*.

Sin embargo pronto se puso de manifiesto que el uso de otros compuestos de carácter detergente entre los que figuraban los tensioactivos no iónicos nonilfenol etoxilado (*NPEO*, del inglés *Nonylphenol Ethoxylate*) y octilfenol etoxilado (*OPEO*, del inglés *Octylphenol Ethoxylate*), en su proceso de biodegradación producían metabolitos como el nonilfenol (*NP*, del inglés *Nonylphenol*) y octilfenol (*OP*, del inglés *Octylphenol*) que aunque no eran formadores de espuma poseían carácter estrogénico y, por tanto, de mayor toxicidad que los compuestos originales. Este hecho determinó que se fuese más exigente con el concepto de biodegradabilidad y se tuviese que distinguir entre biodegradabilidad primaria y biodegradabilidad final o mineralización.

La preocupación de los diferentes gobiernos ante estas problemáticas determinó que comenzaran a aparecer legislaciones que limitaban el uso de estos tensioactivos duros. La primera regulación se promulgó en Alemania en 1961 y exigía que la biodegradación de los tensioactivos

aniónicos fuese del 80% (biodegradación primaria). Con la creación de la Comunidad Económica Europea y posteriormente de la Unión Europea, se intentó armonizar las diferentes legislaciones y así han aparecido sucesivamente distintas directivas, regulaciones y decisiones de obligado cumplimiento para todos los estados miembros. Estas normativas han ido resolviendo los problemas medioambientales conforme se ponían de manifiesto y regulaban el uso de los detergentes en todos los estados miembros. Así, hasta 2004 se promulgaron una gran cantidad de leyes:

- ⇒ **La Directiva 73/404/CEE**, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de detergentes.
  
- ⇒ **La Directiva 73/405/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.
  
- ⇒ **La 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.
  
- ⇒ **La Directiva 82/243/CEE**, que modifica la Directiva 73/405/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.
  
- ⇒ **La Directiva 86/94/CEE**, por la que se modifica la Directiva 73/404/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de detergentes han experimentado considerables modificaciones en diversas ocasiones.

Por motivos de claridad y racionalidad, dichas normas en 2004 han sido actualizadas y refundidas en un sólo texto: **REGLAMENTO (CE) N° 648/2004**<sup>90</sup>, de 31 de marzo de 2004, sobre detergentes y actualmente en vigor. Este reglamento establece normas destinadas a lograr la libre circulación de detergentes y tensioactivos para detergentes en el mercado europeo, garantizando al mismo tiempo una elevada protección del medio ambiente y de la salud humana. A estos efectos, el presente reglamento armoniza algunas normas de comercialización de estas sustancias en lo referente a la biodegradabilidad; a las restricciones o prohibiciones por motivos de biodegradabilidad; al etiquetado adicional de los detergentes; a la información que los fabricantes deben tener a disposición de las autoridades competentes y del personal médico de los Estados miembros. Además establece una nueva definición de detergente que se amplía, y una serie de condiciones, características y límites que estas sustancias deben presentar para su correcta comercialización. La principal novedad es el requerimiento de biodegradación final como necesaria para estipular la limitación de su comercialización. Otra de las novedades es que establece los métodos de ensayos y analíticos para evaluar la biodegradabilidad final de todos los tensioactivos: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfotéricos (estos dos últimos contemplándose por primera vez).

Recientemente, ha sido modificado en sus anexos III y VII en lo referente a los métodos de ensayos de biodegradación final y a normas de etiquetado e informaciones sobre sus ingredientes por el **REGLAMENTO (CE) N° 907/2006**<sup>91</sup>, de 21 de junio de 2006.

---

<sup>90</sup> CEE (2004). Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea 648/2004/CE, sobre detergentes (DO L 104 de 08/04/2004)

<sup>91</sup> CEE (2006). Reglamento n° 907/2006 de la Comisión, de 20 de junio de 2006, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 648/2004, sobre detergentes, con el fin de adaptar sus anexos III y VII (DO L 168 de 21/06/2006)

## 6 - MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL LAS

El amplio uso del LAS en formulaciones de todo tipo desde finales de los 60, ha determinado que este compuesto se haya convertido en el tensioactivo más ampliamente estudiado. Existe numerosa bibliografía que describe métodos de análisis basados en distintos tipos de técnicas y aplicados a matrices de diversa naturaleza. Generalmente, incluyen etapas previas de separación y limpieza con objeto de preconcentrar y minimizar o eliminar posibles interferentes.

A continuación se describen brevemente algunos de los más empleados:

### 6.1 - Métodos volumétricos

Son escasos los métodos propuestos de este tipo. Como representación de ellos, destaca el descrito por Thuman<sup>92</sup> *et col.* (1987), el cual es capaz de discernir entre alquil sulfatos (*SDS*, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate* - dodecilsulfato de sodio) y sulfonatos de alquilbenceno lineales (*LAS*). Consiste en una valoración del tensioactivo aniónico con un tensioactivo de amonio cuaternario (catiónico) disuelto en una mezcla cloroformo/agua, el punto final se pone de manifiesto gracias al cambio de color de rosa a gris que produce una combinación de bromuro de dimidio y erioglaucina en etanol. La mezcla de tensioactivos aniónicos es valorada antes y después de un proceso de hidrólisis para distinguir así entre *SDS* y *LAS*.

---

<sup>92</sup> Thurman E.M., Willoughby T., Barber Jr L.B., Thorn K.A., *Determination of LAS in ground water using macroreticular resins and carbon-13 NMR spectrometry*. Anal. Chem. 59; 1798-1802, 1987



## 6.2 - Métodos espectrométricos

Dentro de este apartado se pueden distinguir métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos. Ambos métodos suelen ser poco selectivos y están sometidos a numerosas interferencias, razón por la cual estas técnicas frecuentemente se emplean como detectores en los métodos separativos. Los primeros se basan generalmente en la formación de un complejo coloreado con el tensioactivo aniónico. Entre ellos se puede citar:

- Determinación de sustancias activas con el azul de metileno (*Methylene Blue Active Substances - MBAS*), es el método de análisis colorimétrico más ampliamente extendido en laboratorios de análisis de rutina. Se fundamenta en la formación de un complejo coloreado del tensioactivo aniónico con el azul de metileno. Este complejo es extraído en cloroformo y su coloración azul es proporcional a la concentración de tensioactivo aniónico. Es un método poco selectivo ya que es sensible a cualquier sustancia aniónica con carácter detergente, de hecho se han realizado estudios donde se compara este método con otros más selectivos<sup>93</sup> (*HPLC*) y se comprueba que solamente una fracción de la concentración obtenida mediante este método es debida al *LAS*.
- Determinación de tensioactivos aniónicos mediante la formación de complejo con tris (1,10 - fenantrolina) Fe (II). El límite de detección para este método de análisis es de  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  cuando

---

<sup>93</sup> Matthijs E., de Henau H., *Determination of LAS in aqueous samples, sediments, sludges and soils using HPLC*. Tenside Surf. Det. 24; 193-199, 1987

la determinación se lleva a cabo colorimétricamente, aunque cabe la posibilidad de utilizar *espectrometría de absorción atómica en horno de grafito*<sup>94</sup>, con este sistema de medida el límite de detección es de  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

- Determinación de tensioactivos aniónicos basada en la extracción del complejo formado entre el tensioactivo y el (bis) etilendiamina cobre (II) en cloroformo<sup>95</sup>. Este método posee un límite de detección de  $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Una variación de este método de análisis consiste en añadir 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) con dietilamina al extracto clorofórmico como reactivo espectrofotométrico para el cobre (II)<sup>96</sup>.

Los métodos espectrofluorimétricos están basados en el hecho de que el LAS presenta una intensa fluorescencia nativa. Como en el caso de los espectrofotométricos, también adolecen de escasa selectividad y son sensibles a las interferencias que con frecuencia les acompañan en las muestras medioambientales (nonilfenoles, sustancias iónicas, ácidos húmicos, etc.) que también muestran fluorescencia. En bibliografía se han encontrado diversos métodos de análisis. Entre los más representativos, destaca el propuesto por Rubio-Barroso<sup>97</sup> *et col.* (1988) para la determinación de tensioactivos aniónicos. Está basado en la formación de

---

<sup>94</sup> Crisp P.T., Eckert J.M., Gibson N.A., Kirkbright G.F., West T.S., *The determination of anionic detergents at ppb levels by graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Anal. Chim. Acta. 87; 97-101, 1976

<sup>95</sup> Crisp P.T., Eckert J.M., Gibson N.A., *The determination of anionic detergents with the bis (ethylenediamine) cooper (II) ion*. Anal. Chim. Acta. 78; 391-396, 1975

<sup>96</sup> Rhama Bhat S., Crisp P.T., Eckert J.M., Gibson N.A., *A Spectrophotometric method for the determination of anionic surfactants at  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  levels*. Anal. Chim Acta, 116; 191-193, 1980

<sup>97</sup> Rubio-Barroso S, Gomez-Rodriguez M., Polo-Díez L.M., *Fluorimetric Determination of Anionic Surfactants by Extraction as the Rhodamine-B ion pair*. Microchem. J. 37; 93-98, 1988

un par iónico con rodamina-B en medio HCl 0.5 N que es extraído con benceno, el método presenta un intervalo lineal comprendido entre 0.02 - 0.50 mg·L<sup>-1</sup>, y se aplica a aguas residuales urbanas con índices de recuperación próximos al 100%.

### 6.3 - Métodos separativos

Son los más numerosos y ampliamente utilizados por las razones de selectividad anteriormente expuestas. A continuación se describen de manera resumida los principales métodos utilizados para la determinación de *LAS*: por cromatografía de gases, cromatografía líquida y electroforesis capilar, con diversos sistemas de detección.

#### 6.3.1 - Cromatografía de gases

Este tipo de cromatografía permite la detección de analitos que sean suficientemente volátiles o que pueden llegar a serlo mediante previa reacción de derivatización. Los distintos componentes del *LAS* poseen una presión de vapor muy baja, siendo por tanto muy poco volátiles, por esta razón la muestra de *LAS* debe sufrir un proceso de derivatización previo a su análisis. Este proceso de derivatización se puede llevar a cabo mediante el empleo de diversos agentes derivatizantes: Tetrabutilamonio hidrogeno sulfato (*TBA*), Tetraetilamonio hidrogeno sulfato (*TTEA*), Tetrametilamonio hidrogeno sulfato (*TMA*), hidróxido de trimetilfenilamonio (*TFMPA*), hidróxido de (trifluorometil) fenilamonio (*TMPA*)<sup>98</sup>, Cl<sub>3</sub>P + trifluoro

---

<sup>98</sup> Field J.A., Miller D.J., Field T.M., Hawthorne S.B., Giger W., *Quantitative determination of aliphatic and aromatic surfactants in sewage sludge by Ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization GC/MS*. Anal. Chem. 64; 3161-3167, 1992

etanol<sup>99</sup>, anhídrido trifluoro acético<sup>100</sup> e incluso desulfonación directa en medio ácido<sup>101</sup>. También es posible realizar el proceso de derivatización en el puerto de inyección. Consiste en someter extractos clorofórmicos provenientes de discos C<sub>18</sub> a la acción de un agente derivatizante en el propio vial. Estos extractos una vez inyectados, generan, en el inyector, el éster derivado correspondiente<sup>102</sup>.

Mediante estos procedimientos se forman los derivados volátiles de los diferentes isómeros y homólogos del LAS neutralizando o eliminando el grupo polar -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> responsable de la baja volatilidad del LAS. En la bibliografía mencionada se utiliza principalmente como sistema de detección la *espectrometría de masas*, además de detectores de ionización de llama (*FID*)<sup>102</sup>, ya que la espectrometría de masas ofrece la posibilidad de identificar a cada componente de la mezcla compleja que constituye el LAS. Esto es posible gracias a la posibilidad de realizar barridos de los distintos fragmentos en que se descompone la molécula; la baja sensibilidad de este modo de actuar se puede paliar seleccionando un fragmento en concreto (modo *SIM - Selected Ion Monitoring*). De este modo, seleccionando el fragmento de cada componente de manera adecuada, es posible diferenciar entre picos cromatográficos parcialmente solapados, como es el caso de los diferentes isómeros que componen cada familia de homólogos. Algunos de estos métodos de análisis de LAS se recogen en la **Tabla 1.7**.

<sup>99</sup> Trehy M.L., Gledhill W.E., Orth R.G., *Determination of LAS and DATS in water and sediment by GC/MS*. Anal. Chem., 62; 2581-2586, 1990

<sup>100</sup> Pratesi C.R., Facceti L., Cassani G., *Anionic surfactants composition by GC/MS*. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, vol LXXVIII, 273-278, 2001

<sup>101</sup> Osburn Q.W., *Analytical methodology for LAS in water and wastes*. J. Am. Oil Chem. Soc. 63; 257-263, 1986

<sup>102</sup> Krueger C.J., Field J.A., *In-vial C18 empore disk elution coupled with injection port derivatization for the quantitative determination of LAS by GC-FID*. Anal. Chem. 67; 3363-3366, 1995

**Tabla 1.7 - Métodos de análisis de LAS mediante cromatografía de gases**

Ref.	Detector	Matriz	Límite de Detección (ppb)
98	Espectrometría de masas	Fangos residuales	Identificación
99	Espectrometría de masas	Muestras acuosas y sólidas	25
100	Espectrometría de masas	Patrones	Identificación
101	Ionización por llama	Muestras acuosas y sólidas	-
102	Ionización por llama	Aguas residuales brutas y tratadas	1500
103	Espectrometría de masas	Sedimentos	50
104	Espectrometría de masas	Aguas residuales y fluviales	1000
105	Espectrometría de masas	Sedimentos de lagos	3 - 42

Previo al análisis cromatográfico se debe incluir una etapa de extracción y purificación que permita extraer el analito de la matriz medioambiental donde se encuentre, además de eliminar posibles interferentes que le acompañen. Para este propósito se han empleado sistemas de extracción que utilizan fluidos supercríticos<sup>98</sup>, extracción Soxhlet, etc.

<sup>103</sup> Ding W.H., Fann J., *Determination of LAS in sediments using pressurized liquid extraction and ion-pair derivatization GC-MS*. Anal. Chim. Acta 408; 291-297, 2000

<sup>104</sup> Ding W., Lo J., Tzing S., *Determination of LAS and their degradation products in water samples by GC with ion trap mass spectrometry*. J Chrom. A. 818; 270-279, 1998

<sup>105</sup> Reiser R., Toljander O., Giger W., *Determination of LAS in recent sediments by GC-MS*. Anal. Chem. 69; 4923-4930, 1997

### 6.3.2 - Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Mediante este tipo de técnica pueden ser analizadas y separadas sustancias de muy distinta naturaleza, tanto volátiles como no volátiles, salvando así las dificultades que plantea la cromatografía de gases donde las sustancias no volátiles deben sufrir un proceso de derivatización.

La técnica se basa en la diferente velocidad de migración que adquieren los distintos componentes de una mezcla cuando atraviesan un lecho fijo o fase estacionaria, que puede ser de naturaleza apolar (modalidad inversa), polar (modalidad normal), con diferente tamaño de poro (cromatografía de exclusión), quirál, etc. Otra ventaja de esta técnica respecto a la cromatografía de gases es el papel activo y no sólo portador que juega la fase móvil, y se permite por tanto la optimización de la composición de la fase móvil como otra variable más del sistema cromatográfico.

Gracias a esta versatilidad y a la escasa volatilidad del *LAS*, la cromatografía líquida ha sido extensamente empleada en el análisis de esta sustancia utilizando como sistema de detección diversas técnicas. Además, dado la naturaleza quirál de varios de los componentes del *LAS*, cabe la posibilidad de utilizar esta técnica para su separación, pudiéndose estudiar así el diferente comportamiento que ambos enantiómeros del racemato pudiesen presentar en el medio.

En la siguiente tabla se recogen algunos de estos métodos.

**Tabla 1.8 - Métodos de análisis de LAS mediante HPLC**

Ref.	Matriz	Tipo de cromatografía	Detección	Límite de Detección
93	Muestras acuosas, fango, sedimento y suelo	Fase inversa	Absorbancia (UV)	10 ppb (m. acuosas)
106	Muestras acuosas	Fase inversa	Fluorescencia	80 ppb
107	Agua marina	Fase inversa	Fluorescencia	2 ppb
108	Aguas residuales brutas y tratadas; lodos	Fase inversa	Espectrometría de masas	0.4 - 2.5 ppb (sólidos)
109	Aguas fluviales tratadas con microbios	Fase inversa	Espectrometría de masas	Identificación
110	Agua marina y de estuario	Fase inversa	Fluorescencia	0.9 ppb
111	Aguas industriales	Fase inversa (Par iónico)	Espectrometría de masas	4.5 ppb
112	Agua marina	Fase inversa	Absorbancia (UV)	100 ppb

<sup>106</sup> Castles M.A., Moore B.L., Ward S., *Measurement of LAS in aqueous environmental samples by HPLC-FD*, Anal. Chem, 61; 2534-2540, 1989

<sup>107</sup> León V.M., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Determinaton of SPC in marine samples by SPE then HPLC*. J. Anal. Chem 371; 479-485, 2001

<sup>108</sup> Riu J., Martínez E., Barceló D., Ginebreda A., *LC-MS determination of LAS and SPC in influent and effluent water samples and sludges from STP*. J. Anal. Chem 371; 448-455, 2001

<sup>109</sup> Knepper T.P., Kruse M., *Investigations into the formation of SPC from LAS by LC-MS*. Tenside Surf. Det. 37; 41-47, 2000

<sup>110</sup> León V.M., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Handling of marine and estuarine samples for the determination of LAS and SPC*. J Chrom. A. 889; 211-219, 2000

<sup>111</sup> Alonso M.C., Castillo M., Barceló D., *SPE procedure of polar benzene and naphtalene sulfonates in industrial effluent followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography/electrospray MS*. Anal. Chem 71; 2586-2593, 1999

<sup>112</sup> Sarrazin L., Wafo W., Revouillon P., *Determination of LAS and its biodegradation intermediates in sea water using SPE and RP-HPLC with UV detection*. J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 22; 2511-2524, 1999

Tabla 1.8 - Continuación

Ref.	Matriz	Tipo de cromatografía	Detección	Límite de Detección
113	Sedimentos	Fase inversa	Fluorescencia	Identificación
114	Patrones	Intercambiador aniónico	Conductividad	14 pmol
115	Aguas residuales industriales	Fase inversa (Par iónico)	Absorbancia (UV)	100 ppb
116	Aguas residuales industriales	Fase inversa (Par iónico)	Absorbancia (UV)	254 ppb
117	Aguas residuales urbanas	Fase inversa	Fluorescencia	Identificación
118	Aguas residuales urbanas	Fase inversa	Fluorescencia	Identificación
119	Agua de grifo, fluvial, etc.	Intercambiador aniónico	Absorbancia (UV)	Identificación
120	Muestras acuosas	Fase inversa	Fluorescencia	0.8 ppb

- <sup>113</sup> Kreisselmeier A., Durbeck H.W., *Determination of alkylphenols and LAS in sediments applying accelerated solvent extraction (ASE)*. Fresenius J. Anal. Chem. 354; 921-924, 1996
- <sup>114</sup> Pan N., Pietrzyk D.J., *Separation of anionic surfactants on anion exchangers*. J. Chrom. A. 706; 327-337, 1995
- <sup>115</sup> Altenbach B., Giger W., *Determination of Benzene and Naphtalene Sulfonates in wastewater by SPE with graphitized carbon black and ion-pair LC with UV detection*. Anal. Chem. 67; 2325-2333, 1995
- <sup>116</sup> Bastian B., Knepper T.P., Hoffmann P., Ortner H.M., *Determination of sulfonic acids in industrial wastewater by ion-pair chromatography*. Fresenius J. Anal. Chem. 384; 674-679, 1994
- <sup>117</sup> Marcomini A., Di Corcia A., Samperi R., Capri S., *RP-HPLC determination of LAS, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products*. J. Chrom. A. 664; 59-71, 1993
- <sup>118</sup> Marcomini A., Di Corcia A., Samperi R., Capri S., *RP-HPLC determination of LAS, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products*. J. Chrom. A. 664; 59-71, 1993
- <sup>119</sup> Yokoyama Y., Kondo M., Sato H., *Determination of alkylbenzenesulphonates in environmental water by anion exchange chromatography*. J. Chrom. 643; 169-172, 1993
- <sup>120</sup> Di Corcia A., Marchetti M., Samperi R., *LC determination of LAS in aqueous environmental samples*. Anal. Chem. 63; 1179-1182, 1991



Tabla 1.8 - Continuación

Ref.	Matriz	Tipo de cromatografía	Detección	Límite de Detección
121	Aguas fluviales	Fase inversa	Absorbancia (UV)	Identificación
122	Fangos y sedimentos	Fase inversa	Fluorescencia	80 ng
123	Patrones	Fase inversa	Absorbancia (UV)	Identificación

Cabe destacar que la mayoría de las determinaciones se realizan en matrices medioambientales (aguas fluviales, marinas, sedimentos, fangos, etc.) utilizando como paso previo la extracción Soxhlet para matrices sólidas (sedimentos, suelos, etc.) y la extracción en fase sólida con adsorbentes de diversa naturaleza ( $C_8$ ,  $C_{18}$ , *SAX*, etc.) para muestras acuosas y sólidas.

### 6.3.3 - Electroforesis capilar

Mediante esta técnica se pueden analizar sustancias cargadas o neutras con un alto grado de resolución. Esto es posible gracias a la forma plana del perfil del frente de fase móvil, que como resultado, contribuye al que el ensanchamiento de banda del analito sea mucho menor.

<sup>121</sup> Fujita I., Osaza Y., Tobino T., Sugimura T., *Determination of LAS in River water by HPLC and concentration by octadecylsilica minicolumn*. Chem Pharm. Bull. 38; 1425-1428, 1990

<sup>122</sup> Marcomini A., Giger W., *Simultaneous determination of LAS, alkylphenol polyethoxilates, and nonylphenol by HPLC*. Anal. Chem. 59; 1709-1715, 1987

<sup>123</sup> Nakae A., Tsuji K., Yamanaka M., *Determination of alkyl chain distribution of LAS by LC*. Anal. Chem. 53; 1818-1821, 1981

Esta técnica puede ser acoplada a detectores comúnmente utilizados en otras técnicas separativas: de fluorescencia, UV-Visible, espectrometría de masas y otros. En bibliografía se han encontrado pocos trabajos que utilicen esta técnica para la determinación de LAS.

En la siguiente tabla se recogen de manera resumida algunos de ellos:

**Tabla 1.9 - Métodos de determinación de LAS mediante electroforesis capilar**

Ref.	Detector	Matriz	Límite de Detección
124	Espectrometría de masas	Aguas residuales	4.4 ppb
125	Espectrometría de masas y Absorbancia (UV)	Aguas residuales y costeras	1 ppb
126	Absorbancia (UV)	Lodos residuales	4000 ppb
127	Absorbancia (UV)	Patrones	12000 ppb
128	Absorbancia (UV)	Agua de río, lodo, productos fabricados	Identificación

<sup>124</sup> Riu J., Barceló D., *Determination of LAS and their polar carboxylic degradation products in sewage treatment plant by automated SPE followed by CE-MS*. Analyst 126; 825-828, 2001

<sup>125</sup> Riu J., Eichhorn P., Guerrero J.A., Knepper T.P., Barceló D., *Determination of LAS in wastewater treatment plant and coastal water by automated SPE followed by CE-UV detection and confirmation by CE-MS*. J. Chrom. A. 889; 221-229, 2000

<sup>126</sup> Heinig K., Vogt C., Werner G., *Determination of LAS in industrial and environmental samples by Capillary electrophoresis*. Analyst 123; 349-353, 1998

<sup>127</sup> Muñoz Soto G., González A., Cuadros L., Alonso E., Vilchez J.L., *On the estimate of CE blanks: Application to the detection limits evaluation as recommended by IUPAC*. J. Cap. Elec. 4; 15-19, 1997

<sup>128</sup> Heinig K., Vogt C., Werner G., *Separation of ionic and neutral surfactants by CE and HPLC*. J. Chrom. A 745; 281-292, 1996

Tabla 1.9 - Continuación

Ref.	Detector	Matriz	Límite de Detección
129	Absorbancia (UV)	Lodos	34 ppb
130	Absorbancia (UV)	Patrones, productos fabricados	Identificación
131	Absorbancia (UV)	Productos fabricados; Agua de río	4800 ppb

En la bibliografía antes mencionada se describe un fenómeno por el cual moléculas de *LAS* y de otros tensioactivos aniónicos (ej: dodecilsulfato sódico - *SDS*) sufren un proceso denominado “asociación solvofóbica”<sup>132</sup> que consiste en la formación de complejos de asociación entre ambas sustancias. Cuando en la fase móvil se encuentran altas concentraciones de disolvente orgánico (ej: acetonitrilo) el *SDS* no forma micelas. Esto es debido a que los monómeros interactúan con el disolvente orgánico más fuertemente que con otras moléculas de *SDS*, no obstante, sí, existe interacción con moléculas de *LAS*. La separación puede tener lugar basándose en la formación de complejos de diferente fortaleza dependiendo de la hidrofobicidad de cada componente.

<sup>129</sup> Kanz C., Nolke M., Fleischmann T., Kohler H.-P. E., Giger W., *Separation of Chiral Biodegradation Intermediates of LAS by Capillary Electrophoresis*. Anal. Chem. 70; 913-917, 1998

<sup>130</sup> Desbène P.L., Rony C., Desmazières B., Jacquier J.C., *Analysis of alkylaromatic sulphonates by HPCE*. J. Chrom. A. 608; 375-383, 1992

<sup>131</sup> Vogt C., Heinig K., Langer B., Mattusch J., Werner G., *Determination of LAS by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis*. Fresenius J. Anal. Chem. 352; 508-514, 1995

<sup>132</sup> Shi Y., Fritz J.S., *HPCZE of nonionic compounds using a novel anionic surfactant additive*. Anal. Chem. 67; 3023-3027, 1995

## 7 - TRATAMIENTO DE MUESTRAS

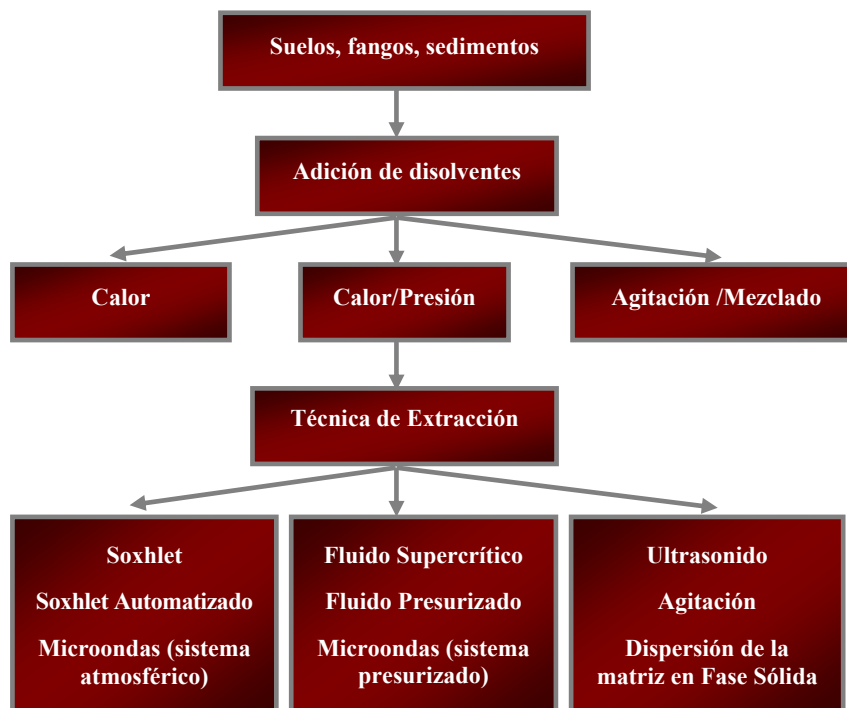
De las etapas que componen el proceso de análisis, una de las más críticas es, sin duda, el tratamiento de la muestra. En el caso de muestras sólidas, el proceso se puede generalizar de la siguiente manera. En primer lugar, la muestra debe ser triturada y homogeneizada para permitir una toma de muestra representativa y aumentar el área superficial, lo que facilita la extracción de los analitos. A continuación, los analitos son extraídos de la matriz con un disolvente adecuado, que puede variar en función de las características de los analitos, de la matriz y del proceso elegido para ello.

Con esta finalidad pueden ser empleadas diversas técnicas, como Soxhlet, ultrasonido, microondas, con fluidos supercríticos, por agitación, etc. Normalmente, una vez que los compuestos de interés se encuentran en disolución, es necesario realizar un proceso de limpieza para eliminar posibles interferencias. Para ello se pueden emplear técnicas, como la extracción líquido-líquido (*LLE*) o la extracción en fase sólida (*SPE*). Finalmente, a veces se realiza una preconcentración y/o un cambio del disolvente para adecuar la disolución a inyectar al sistema de análisis que se pretende utilizar.

Como tendencias en la investigación actual se puede citar: reducción del volumen de extractante y del tiempo de extracción y aumento de la eficacia, para ello se van incorporando nuevas técnicas<sup>133</sup>. En la siguiente figura se muestra un resumen del proceso:

---

<sup>133</sup> Dean, J.R. *Methods for Environmental Trace Analysis*. John Wiley & Sons, ISBNs: 0-470-84421-3 (HB); 0-470-84422-1 (PB), Chichester, UK, 2003



**Figura 1.24** - Métodos de extracción de analitos en matrices sólidas

Para la determinación del LAS en distintas muestras medioambientales sólidas y semisólidas, existe una numerosa bibliografía que describe los métodos de extracción desde la matriz. En la siguiente tabla se muestran algunos de los más representativos y a continuación se comentan las técnicas más empleadas:

**Tabla 1.10** - Métodos de extracción del LAS en matrices medioambientales sólidas o semisólidas

Ref.	Matriz	Método de Extracción	Tiempo
<sup>93</sup>	Sedimento de río, lodo, suelo enmendado	Reflux	2 horas

Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Método de Extracción	Tiempo
134	Suelo enmendado con lodo	Reflux	4 horas
135	Sedimento de río	Soxhlet	12 horas
136	Sedimento de río	Soxhlet Soxhlet + Microondas	12 - 24 horas 2 horas
74	Sedimento, suelo, lodo, detergente	Soxhlet	30 min: detergente 4 - 12 h: lodo, sed., suelo
106	Sedimentos de lago y río	Soxhlet	15 horas
25	Suelo, lodo, plantas	Soxhlet	16 horas (x 2)
137	Sedimento marino	Soxhlet	16 horas
111	Sedimento marino	Soxhlet	12 horas
138	Sedimento marino	Soxhlet	5 horas

<sup>134</sup> Comellas L., Portillo J.L., Vaquero M.T., *Development of an analytical procedure to study LAS degradation in sewage sludge-amended soils*. J. Chrom. A 657; 25-31, 1993

<sup>135</sup> Akyüz M., Roberts D.J., *Determinations of linear alkylbenzene sulfonates and their biodegradation intermediates by isocratic RP-HPLC*. Turk. J. Chem. 26; 669-679, 2002

<sup>136</sup> Morales-Muñoz S., Luque-García J.L., Luque de Castro M.D., *Screening method for LAS in sediments based on water Soxhlet extraction assisted by focused microwaves with on-line preconcentration/derivatization/detection*. J. Chrom. A 1026; 41-46, 2004

<sup>137</sup> González-Mazo E., Forja J.M., *Fate and Distribution of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in the Littoral Environment*. Environ. Sci. Technol. 32; 1636 -1641, 1998

<sup>138</sup> Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Determination and distribution of Alkyl Ethoxysulfates and LAS in coastal marine sediments from the Bay of Cadiz (Southwest of Spain)*. Environ. Toxicol. Chem. 24; 2196-2202, 1996

Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Método de Extracción	Tiempo
101	Sedimento	Soxhlet	16 horas
139	Suelo	Soxhlet	8 horas
140	Organismos marinos	Soxhlet	6 - 8 horas
141	Suelo	Soxhlet	16 horas
142	Suelo, Lodo	Soxhlet	6 horas
143	Suelo enmendado	Soxhlet	4 horas
144	Lodo	Soxhlet	6 horas
103	Sedimento de lago	Fluido Presurizado	35 minutos
114	Sedimento de río	Fluido Presurizado	15 minutos

<sup>139</sup> Elsgaard L, Pojana G., Miraval T., Eriksen J., Marcomini A., *Biodegradation of LAS in sulphate-leached soil mesocosms*. Chemosphere 50; 929-937, 2003

<sup>140</sup> Sáez M., León V.M., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Extraction and isolation of LAS and their intermediate metabolites from various marine organisms*. J. Chrom. A 889; 99-104, 2000

<sup>141</sup> Andreu V., Picó Y., *Determination of LAS and their degradation products in soils by liquid chromatography-electrospray-ion trap multiple stage mass spectrometry*. Anal. Chem. 76, 2878-2885, 2004

<sup>142</sup> Küchler T., Schnaak W., *Behaviour of LAS in sandy soils with low amounts of organic matter*. Chemosphere 35; 153-167, 1997

<sup>143</sup> Holt M.S., Matthijs E., Waters J., *The concentrations and fate of LAS in sludge amended soils*. Water Res. 23; 749-759, 1998

<sup>144</sup> León V.M., López C., Lara-Martín P.A., Prats D., Varó P., González-Mazo E., *Removal of LAS and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment*. Chemosphere 64; 1157-1166, 2006

Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Método de Extracción	Tiempo
145	Sedimento de río	Fluido Presurizado	45 minutos
146	Organismos marinos	Fluido Presurizado	20 minutos
147	Sedimento marino	Fluido Presurizado	15 minutos
148	Suelo enmendado con lodo	Fluido Presurizado	15 minutos
149	Sedimento marino	Fluido Presurizado	15 minutos
150	Sedimento marino	Fluido Presurizado Soxhlet	15 minutos 5 horas

- <sup>145</sup> Kreisselmeier A., Dürbeck H.W., *Determination of alkylphenols, alkylphenoxyoxylates and linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical liquid extraction*. J.Chom. A 775; 187-196, 1997
- <sup>146</sup> Álvarez Muñoz A. Sáez M., Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *New extraction method for the analysis of LAS in marine organisms: Pressurized liquid extraction versus Soxhlet extraction*. J. Chom. A 1052; 33-38, 2004
- <sup>147</sup> González S., Petrovic M., Barceló D., *Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates (LAS), coconut diethanol amide, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian Area (NE Spain)*. J Chrom. A 1052; 111-120, 2004
- <sup>148</sup> Eichhorn P., López O., Barceló D., *Application of liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the identification and characterisation of LAS and SPCs in sludge-amended soils*. J.Chrom. A 1067, 1-2; 171-179, 2005
- <sup>149</sup> Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of major surfactants in marine sediments*. Int. J. Environ. Ana. Chem. 85; 4-5,293-303, 2005
- <sup>150</sup> Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Simultaneous extraction and determination of anionic surfactants in waters and sediments*. J.Chrom. A 1112; 205-210, 2006



Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Métodos de Extracción	Tiempo
151	Sedimento y agua de río, marina; agua de presa	Fluido Presurizado Soxhlet	15 minutos
98	Lodo	Fluido Súper Crítico	15 minutos
152	Suelo, sedimento y lodo	Fluido Súper Crítico	30 minutos
153	Sedimento de río	Fluido Súper Crítico	50 minutos
154	Sedimento de río	Agitación	24 horas (x 3)
155	Suelo	Agitación	1 hora
156	Lodo	Agitación	1 hora
157	Suelo	Ultrasonido	1 hora

- <sup>151</sup> Lara-Martín P.A., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Development of a method for the simultaneous analysis of anionic and non-ionic surfactants and their carboxylated metabolites in environmental samples by mixed-mode liquid chromatography–mass spectrometry*. J.Chrom. A 1137; 188-197, 2006
- <sup>152</sup> Hawthorne, S.B.; Miller, D.J.; Walker, D.D.; Whittington, D.E.; Moore, B.L. *Quantitative extraction of linear alkylbenzenesulfonates using supercritical carbon dioxide and a simple device for adding modifiers*. J.Chrom. A 541; 185-194, 1991
- <sup>153</sup> Priego-López E., Luque de Castro M.D., *Superheated water extraction of LAS from sediments with on-line preconcentration/derivatization/detection*. Anal. Chim. Acta 511, 2; 249-254, 2004
- <sup>154</sup> Tabor C.F., Barber L.B., *Fate of LAS in the Mississippi River*. Environ. Sci. Technol. 30; 1, 161-171, 1995
- <sup>155</sup> Vinther, F.P.; Mortensen, G.K.; Elsgaard, L. *Effects of LAS on functional diversity of microbial communities in soil*. Environ. Toxicol. Chem. 22; 35-39, 2003
- <sup>156</sup> Ruiz F.J., Rubio S., Pérez-Bendito D., *Potential of coacervation processes for the extraction of amphiphiles (LAS) from sewage sludge samples prior to liquid chromatography*. J. Chrom. A 1030; 109-115, 2004
- <sup>157</sup> Ou Z.Q., Jia L.Q., He Y.W., Sun T.H., Shang D.S., *Extraction and HPLC determination of LAS in water and soils*. Chin. J. Ecol. 15; 1, 67-71, 1996

Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Métodos de Extracción	Tiempo
158	Tejido vegetal	Ultrasonido	1 hora
159	Suelo enmendado con lodo	Ultrasonido	20 minutos
160	Sedimento de lago	Ultrasonido	30 minutos (x 3)
161	Sedimento de lago	Ultrasonido	15 minutos
108	Lodo	Ultrasonido	20 minutos (x 3)
99	Sedimento de río	Ultrasonido	10 minutos
162	Sedimento marino	Ultrasonido	20 minutos (x3)
163	Lodo	Ultrasonido	20 minutos (x3)

<sup>158</sup> Ou Z.Q., Jia L.Q., Jin H.Y., Yediler A., Yang G.F., Kettrup A. *Ultrasonic extraction and LC determination of LAS in plant tissues*. Chromatographia 44; 7-8, 417-420, 1997

<sup>159</sup> Andreu V., Rubio J.L., Picó Y., *Potencial hazards for the use of some soil conservation practices: The presence of LAS and their carboxylic degradation products in amended soils: a case study*. Presented in ISCO 2004 - 13<sup>o</sup> International Soil Conservation Conference - Brisbane, Australia, July 2004

<sup>160</sup> Inaba K., Amano K., *HPLC determination of LAS in aquatic environmental. Seasonal changes in LAS concentration in polluted lake water and sediment*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 34; 203-213, 1988

<sup>161</sup> Sarrazin L., Diana C., Wafo E., Rebouillon P., *Levels of LAS in Sediments of the Berre Lagoon (France)*. Int. J. Environ. Stud. 60; 229-240, 2003

<sup>162</sup> Petrovic M., Fernández-Alba A.R., Borrull F., Marce R.M., González-Mazo E., Barceló D., *Occurrence and distribution of nonionic surfactants, their degradation products, and LAS in coastal waters and sediments in Spain*. Environ. Toxicol. Chem. 21; 37-46, 2002

<sup>163</sup> Petrovic M., Barceló D., *Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry* Anal. Chem. 72; 4560-4567, 2000

Tabla 1.10 - Continuación

Ref.	Matriz	Métodos de Extracción	Tiempo
164	Suelo	Microondas	50 minutos (x 2)
165	Pescados	Dispersión de la matriz en Fase Sólida	-

### 7.1 - Extracción Asistida por Ultrasonido

Para facilitar la extracción del analito, en esta tesis, se utilizó el auxilio del ultrasonido. Por esta razón se va a exponer un breve resumen de su fundamento y aplicaciones.

El sonido puede ser definido como una vibración mecánica transmitida por un medio elástico, pudiendo caracterizarse, como cualquier onda, por su frecuencia y su intensidad.

En la especie humana el margen medio de audición es de 10 - 16.000 Hz. Las frecuencias superiores a 20.000 Hz se denominan ultrasonidos.

En la naturaleza se puede encontrar animales que utilizan el ultrasonido como medio de orientación, comunicación, localización de alimentos, defensa, etc. Ya el ser humano empezó a aprovechar de los beneficios del

<sup>164</sup> Carlsen L., Kjelsmark J., Volfing M.-B., *LAS in Soil. A Field Study of Different Soil Profiles*. Research Notes n° 134 from NERI, National Environmental Research Institute, Roskilde, Denmark, p. 28, 2000

<sup>165</sup> Tolls J., Haller M., Sijm D.T.H.M., *Extraction and Isolation of LAS and its Sulfophenylcarboxylic Acid Metabolites from Fish Samples*. Anal Chem. 71; 5242-5247, 1999

ultrasonido a partir de su descubrimiento realizado por Jacques y Pierre Curie cuando publicaron los resultados obtenidos al experimentar la aplicación de un campo eléctrico alternante sobre cristales de cuarzo y turmalina, los cuales produjeron ondas sonoras de muy altas frecuencias, al estudiar el efecto piezoeléctrico<sup>166</sup>. En 1883, apareció el llamado silbato de Galton, usado para controlar perros por medio de sonido inaudible a los humanos. John Thornycroft y Sydney W. Barnaby en el año 1894, durante pruebas con misiles lanzados a partir de un submarino, notaron que en el momento de la propulsión de estos misiles, se originaba una fuente de vibración que causaba la implosión de burbujas y/o cavidades en el agua<sup>167, 168</sup>. Esta vibración recibió el nombre de cavitación.

En 1912, a raíz del hundimiento del Titanic, hubo una preocupación mucho mayor en conocer la topografía del fondo del mar. En este mismo año, L. F. Richardson, sugirió la utilización de ecos ultrasónicos para detectar objetos sumergidos. Entre 1914 y 1918, durante la Primera Guerra Mundial, se trabajó intensamente con esta idea, intentando detectar submarinos enemigos.

En 1917, Paul Langevin y Chilowsky produjeron el primer generador piezoeléctrico de ultrasonido, cuyo cristal servía también como receptor y generaba cambios eléctricos al recibir vibraciones mecánicas. El aparato fue utilizado para estudiar el fondo marino, como

---

<sup>166</sup> Lorimer J. P., Mason T. J., *Sonochemistry Part 1 - The physical aspect*. Chem. Soc. Rev. 16; 239-274, 1987

<sup>167</sup> Suslick K. S., *The Chemical Effects of Ultrasound*. Sci. Americ. 260; 80-86, 1989

<sup>168</sup> Suslick K. S., *The Year Book of Science and the Future*. Encyclopedia Britannica Inc., Chicago, USA, p. 139, 1994

---

como una sonda ultrasónica para medir profundidad.

Alfred Loomis fue el primer químico que reconoció el efecto anormal de las ondas sonoras intensas propagándose por un líquido, en 1927. Este efecto fue denominado “efecto sonoquímico”. En 1929, Sergei Sokolov, científico ruso, propuso el uso del ultrasonido para detectar grietas en metal.

Entre 1939 y 1945, durante la Segunda Guerra Mundial, el sistema inicial desarrollado por Langevin, se convirtió en el equipo de norma para detectar submarinos, conocido como ASDIC (*Allied Submarine Detection Investigation Committes*). Más adelante, el sistema se convertiría en el SONAR (*Sound Navegation and Ranging*), cuya técnica perfeccionada es norma en la navegación<sup>166</sup>.

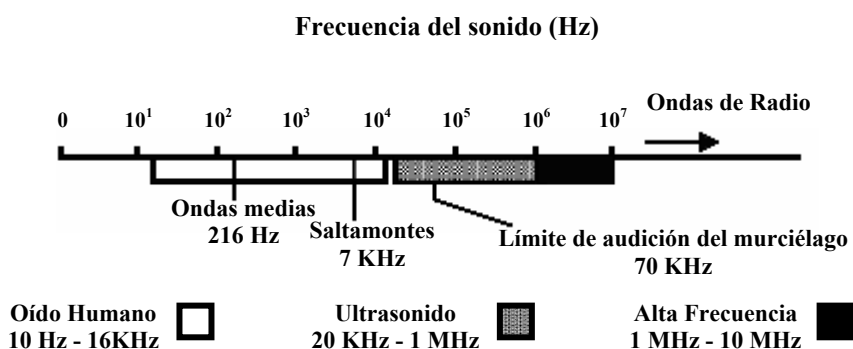
En 1940, Firestone desarrolló un reflectoscopio que producía pulsos cortos de energía que se detectaban al ser reflejada en las grietas y fracturas. Desde la década de los 40 hasta el principio de los 80, hubo un importante progreso en la utilización del ultrasonido relacionado sobre todo con su aplicación como recurso técnico para el diagnóstico de imagen.

A partir de 1980, la sonoquímica experimentó un gran avance tecnológico y se realizaron muchas publicaciones estudiando diversos tipos de sistemas<sup>167</sup>.

Las transformaciones químicas y físicas pueden ocurrir debido a la interacción de la radiación con la materia. Así, es importante conocer

el efecto que puede producir la radiación ultrasónica.

Como es sabido, las frecuencias de 1 a 10 MHz corresponden a la región de alta frecuencia<sup>166, 169</sup>. El símbolo internacional del ultrasonido es ))).

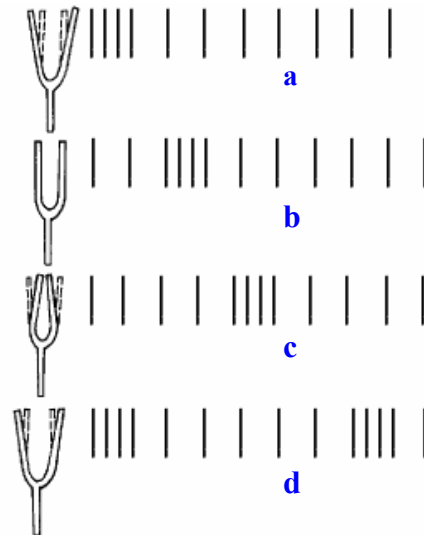


*Figura 1.25 - Región de frecuencia del sonido<sup>169</sup>*

La propagación del ultrasonido puede ser ilustrada a través del movimiento de un diapasón en el medio de propagación, *Figura 1.26*. Cuando el diapasón entra en movimiento expandiéndose (*Figura 1.26 a*) comprime las moléculas más cercanas, constituyendo en el primer nodo de la onda. Cuando entra en equilibrio, no hay compresión ni expansión cerca del diapasón (*Figura 1.26 b*). Cuando se comprime el diapasón, ocurre la descompresión del sistema (*Figura 1.26 c*). Así, el movimiento del diapasón causa un movimiento periódico de compresión y expansión de las moléculas cercanas (*Figura 1.26 d*), resultando en la propagación de las ondas ultrasónicas<sup>170</sup>.

<sup>169</sup> Mason T. J., *Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry*. Mason T. S. Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, cap. 1, p. 1, 1990

<sup>170</sup> Lorimer J. P., *Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry*. Mason T. S. Ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, cap. 2, p. 9, 1990



**Figura 1.26** - Ondas de presión en el aire producidas por un diapason<sup>170</sup>

Para que haya propagación de las ondas ultrasónicas es necesario que el medio de propagación tenga propiedades elásticas. De este modo, el movimiento de un cuerpo vibrando es transmitido a las moléculas vecinas, las cuales, antes de regresar a la posición de equilibrio, transmiten este movimiento para las moléculas que están a su alrededor. Este movimiento periódico genera ciclos de compresión y expansión<sup>170</sup>.

La acción de las ondas ultrasónicas generan una presión acústica<sup>166, 170</sup> ( $P_a$ ) en el medio de propagación que es dada por la siguiente ecuación:

$$P_a = P_A \text{ sen } 2\pi f t \quad (1.5)$$

Donde  $P_a$  es la presión adicional a la presión hidrostática ( $P_h$ ) ambiente;  $P_A$  es la presión de amplitud máxima de la onda;  $f$  es la frecuencia de la onda ( $> 16$  KHz) y  $t$  es el tiempo.

La intensidad<sup>166, 170</sup> ( $I$ ) es dada por la ecuación:

$$\mathbf{I} = \mathbf{P}_A^2 / 2 \rho v \quad (1.6)$$

Donde  $\rho$  es la densidad del medio y  $v$  es la velocidad del sonido en el medio.

La propagación de las ondas ultrasónicas es atenuada debido a la vibración de las moléculas del medio de propagación, como consecuencia, ocurre una disminución de la energía de estas ondas. Esta atenuación<sup>166, 170</sup> es dada por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{I} = \mathbf{I}_0^{(-2 \alpha' l)} \quad (1.7)$$

Donde  $I$  es la intensidad atenuada;  $I_0$  es la intensidad de la fuente de radiación;  $\alpha'$  es el coeficiente de absorción y  $l$  es la distancia de la fuente de radiación.

Kirchoff<sup>171</sup> dedujo una expresión que relaciona el coeficiente de absorción ( $\alpha'$ ) con la viscosidad y con la conductividad del medio, ecuación 1.8:

$$\alpha' = 2\pi^2 f^2 / \rho v^3 [ \eta_b + 4/3 \eta_s + (\gamma + 1) \kappa' / C_p ] \quad (1.8)$$

Donde  $\eta_s$  es la fuerza de corte o cizalladura;  $\eta_b$  es la viscosidad de la cavidad;  $\kappa'$  es la conductividad térmica del medio;  $C_p$  es el calor específico a la presión constante y  $\gamma$  es la capacidad calorífica.

De esta forma puede deducirse, por ejemplo, que si una onda ultrasónica con

---

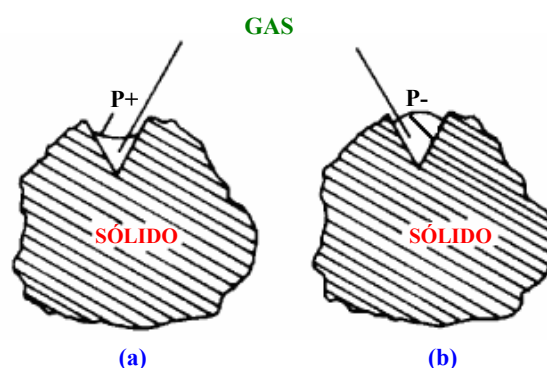
<sup>171</sup> Kirchhoff G., *Ueber den Einfluss der Wärmeleitung in einem Gase auf die Schallbewegung*. Ann. Phys. Chem. 134; 177-193, 1868



frecuencia de 20 KHz, al recorrer una distancia de 30 Km su intensidad se reduce a la mitad. Sin embargo, una onda ultrasónica con frecuencia de 118 KHz, su intensidad se reducirá a la mitad al recorrer una distancia de 1 Km.

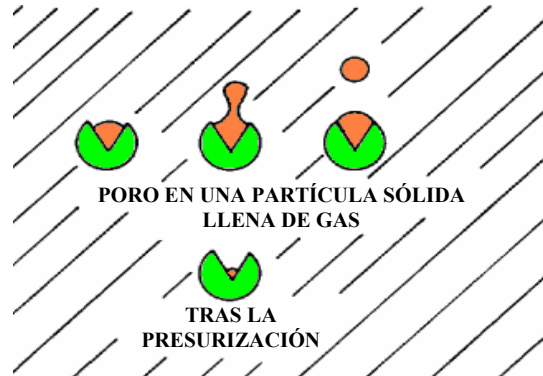
La cavitación es un fenómeno físico<sup>167</sup> que se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones rápidamente alternativas de alta amplitud. Por ello es lógico que tenga lugar la cavitación en un líquido irradiado con ultrasonido de alta energía.

En un líquido con partículas sólidas dispersas, los gases son adsorbidos en los poros de las partículas<sup>166, 170, 172</sup> como ilustrado en la **Figura 1.27**. En la etapa de compresión, los gases o vapores en el interior de la cavidad, son comprimidos hacia el interior de los poros de la partícula, **Figura 1.27 a**; y en la etapa de expansión, los gases o vapores son dirigidos hacia el exterior de la partícula, **Figura 1.27 b**. La cavidad aumenta de tamaño en dirección al interior del líquido, mientras que los gases se separan de la partícula permaneciendo un núcleo en la cavidad<sup>172</sup>, **Figura 1.28**:



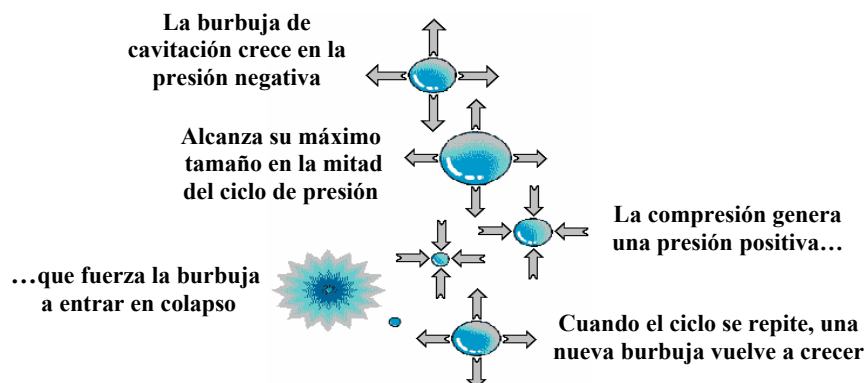
**Figura 1.27** - Efecto de la presión<sup>166</sup> en el gas aprisionado en el poro de una partícula: (a) presión positiva; (b) presión negativa

<sup>172</sup> Suslick K. S., *Modern Synthetic Methods*, Schelfold R., Ed., Springer Verlag, Berlin, Germany, v. 4, p. 1, 1986

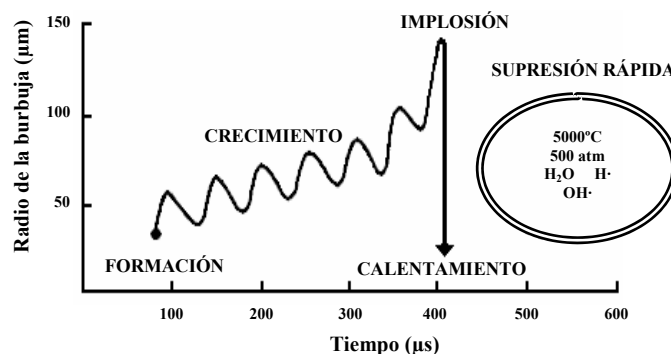


*Figura 1.28 - Nucleación de la cavidad acústica<sup>172</sup>*

El origen de la cavitación se debe al hecho de que, durante la expansión, los gases adsorbidos en el líquido alrededor de la cavidad o en la interfase, son evaporados originando la expansión de la cavidad. Durante la etapa de compresión, estos gases o vapores no regresan completamente al líquido, originando un aumento efectivo de la cavidad. Ciclos periódicos de compresión y expansión ocasionan el aumento del tamaño de la cavidad. Llega un momento en que esta cavidad alcanza un tamaño crítico y sufre una implosión, liberando una alta cantidad de calor y presión en un período de tiempo muy corto y en determinados puntos del líquido<sup>166, 167</sup>. Estas etapas están representadas en la *Figura 1.29* y *Figura 1.30*:



*Figura 1.29 - Esquema de implosión de una burbuja*



**Figura 1.30** - Proceso de formación, crecimiento e implosión de una burbuja en un líquido irradiado con ultrasonido<sup>167</sup>

No es fácil calcular teóricamente o medir experimentalmente<sup>166, 167, 168, 170</sup> la temperatura y la presión exactas durante la implosión. En el aparato de ultrasonido la precisión del termómetro está limitada por su inercia debido al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio térmico entre el termómetro y el medio líquido de propagación. Por tanto, el termómetro mide la media del calentamiento de la compresión y del resfriamiento de la expansión. La temperatura de la implosión<sup>167</sup> puede ser determinada indirectamente basándose en la dependencia de la cinética de reacciones conocidas en función de la temperatura, concluyendo que la temperatura de implosión en el interior de la cavidad puede llegar cerca de  $5500^\circ\text{C}$  (similar a de la superficie solar), mientras que alrededor de la cavidad cerca de  $2100^\circ\text{C}$ . La presión está estimada en torno de los  $500 \text{ atm}$ . Estos valores de temperatura y presión alcanzados en determinados puntos localizados por período de tiempo muy corto, durante la implosión de la cavidad, provocan un efecto inusual en las reacciones químicas.

En suma, la cavitación es el fenómeno principal y responsable por las

reacciones sonoquímicas<sup>173, 174</sup>, siendo este fenómeno dependiente de parámetros<sup>175</sup>, tales como:

- *Frecuencia*. A mayores frecuencias, el tiempo dado a la burbuja para que crezca y afecte al sistema es menor, por lo que el efecto de la cavitación disminuye;
- *Viscosidad del medio de propagación*. Cuanto más viscoso es un líquido, menor es el efecto de la cavitación;
- *Temperatura*. Cuanto mayor es la temperatura, la cavitación tienen lugar para intensidades acústicas menores;
- *Presión externa*. El aumento de este factor provoca una mayor violencia en la colisión de las burbujas;
- *Intensidad*. En general, a mayor intensidad ultrasónica, mayor es el efecto de este fenómeno.

La utilización del ultrasonido en la química, como en otras áreas de la ciencia, está aumentando constantemente<sup>169</sup>. Son numerosos los factores que intervienen en el ultrasonido y son claves para el estudio de sus aplicaciones: frecuencia, potencia radiada, duración de las radiaciones, pérdidas en el medio, etc. También hay que considerar los efectos sobre el medio: desplazamiento de las partículas, presión acústica, etc.

---

<sup>173</sup> Mizukoshi Y., Nakamura H., Bandow H., Maeda Y., Nagata Y., *Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate* Ultrason. Sonochem. 6; 203-209, 1999

<sup>174</sup> Raso J., Manas P., Pagán R., Sala F.J., *Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound*. Ultrason. Sonochem. 5; 157-162, 1999

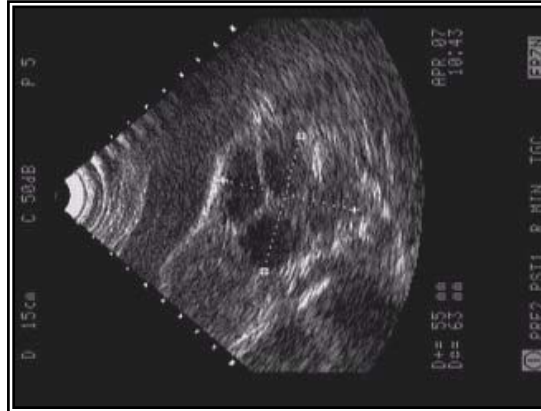
<sup>175</sup> Mason T.J., Lorimer J.P., *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry*. Ellis Horwood Limited. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 251, 1988

Básicamente, las aplicaciones del ultrasonido pueden ser divididas en: ensayos no destructivos y ensayos destructivos. Los primeros son aplicaciones del ultrasonido en frecuencias altas (por encima de 3 MHz), pues a esta frecuencia todavía no es posible generar una potencia capaz de causar cavitación (colapso de las burbujas producidas). Generalmente el ultrasonido no destructivo es empleado en esta frecuencia para diagnósticos médicos. El ultrasonido destructivo es empleado principalmente en el campo de la química y física.

A continuación se comenta algunas de las principales aplicaciones de los ultrasonidos.

- **Navegación y sondeo**: Es una de las principales aplicaciones del ultrasonido. Fundamentalmente se refiere a la acústica submarina, sobre todo aplicado en el sondeo del fondo del mar, navegación de submarinos, detección de bancos de pescado, etc. Sin embargo, actualmente hay otras aplicaciones como puede ser el control de robots con navegación autónoma.

- **Medicina y Biología**: La utilización más difundida es como herramienta en la diagnosis. La técnica más conocida es la ecografía. Su fundamento consiste en “inyectar” ultrasonidos a través de la piel en el organismo del paciente (baja intensidad, en torno a unos pocos milivatios). Éstos se reflejan a medida que vayan pasando de unos medios a otros y los ecos son procesados para mostrarlos finalmente por pantalla. Se hace uso de una sustancia gelatinosa sobre la piel antes de producir los ultrasonidos, para que se evite la reflexión excesiva del ultrasonido en la propia superficie de la piel. A continuación se puede apreciar una ecografía cardiaca:



*Figura 1.31 - Ecocardiografía Doppler*

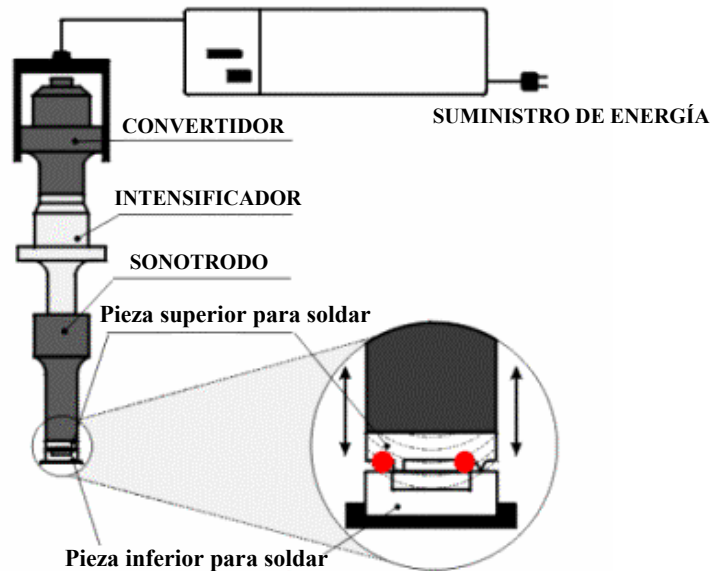
También se emplea el ultrasonido con fines terapéuticos ya que, científicos de varias universidades británicas han demostrado que la energía de estas ondas puede aumentar la cantidad de medicamento que entra en las células. El fundamento consiste en que el ultrasonido crea poros en las membranas celulares que regulan de algún modo la entrada de fármacos en la célula. Otras investigaciones se centran en el control del flujo sanguíneo cerebral, lo cual sería de gran ayuda a los médicos para prevenir crisis en este órgano.

- **Tratamiento de alimentos:** Primeramente, hay que decir que todavía está siendo investigado el empleo del ultrasonido en la tecnología de alimentos. La aplicación del ultrasonido consiste en destruir los microorganismos que dañan los alimentos pero sin afectar a la apariencia externa de los mismos. La acción de la radiación ultrasónica es destruir la membrana celular de estos organismos, provocándoles la muerte. De todas formas, esta técnica no es válida para cualquier producto puesto que algunos conducen muy bien los ultrasonidos y otros no. Recientemente también se está investigando la aplicación de ultrasonido para la purificación del agua, concretamente para la limpieza de filtros. La clave

está en el fenómeno de la cavitación: si se logra que se produzcan burbujas y que éstas colisionen limpiando la suciedad de los filtros, se tendrá un excelente método para depurar el agua. Las técnicas ultrasónicas también tienen su aplicación en el cálculo del porcentaje de grasa de un alimento. Esto se debe a que el hueso, el músculo y la grasa poseen impedancias acústicas (la resistencia de un material a las vibraciones de las ondas ultrasónicas) distintas, luego se puede medir el grosor del tejido graso y hacer una estimación del total de grasa contenido en el cuerpo.

- **Aplicaciones físicas**: El ultrasonido es empleado, esencialmente en la medida de las propiedades elásticas y las condiciones de propagación en los sólidos. Otras aplicaciones se centran en el estudio de explosiones, determinación de las propiedades físicas de líquidos y gases, localización de baches de aire (fundamental para la navegación aérea), etc.

- **Aplicaciones industriales**: La utilización del ultrasonido en la industria es muy diversa (detectores de defectos en piezas metálicas, medición de espesor de las mismas, apertura automática de puertas, etc.). Quizá una de las aplicaciones más importantes en este sentido sea la soldadura de plásticos por ultrasonidos, presentando múltiples ventajas: no es necesario un precalentamiento, es muy rápido, no genera contaminantes, la unión es en general mejor que con otros métodos, etc. La pieza clave, como se puede ver en la **Figura 1.32**, es el sonotrodo, aparato hecho de aluminio y/o titanio normalmente (materiales con buenas propiedades acústicas) que convierte los ultrasonidos en energía calorífica, la cual funde el plástico y lo une. Evidentemente, dicha energía es proporcional a la amplitud de la onda ultrasónica. Las frecuencias de trabajo se sitúan entre los 20 y 40 KHz y la potencia es del orden de algunos miles de Vatios. A continuación se representa el sonotrodo usado para la soldadura de plásticos:



*Figura 1.32* - Aparato de ultrasonido

• **Aplicaciones químicas:** Los ultrasonidos también presentan múltiples aplicaciones en el campo de la Química. Su principal función en este campo es la de activar ciertos compuestos con el fin de acelerar las reacciones químicas en los procesos de fabricación de materiales organometálicos. También hay una gran variedad de aplicación del ultrasonido para ensayos destructivos y un amplio intervalo de frecuencia (20 KHz a 3 MHz). Según Berliner<sup>176</sup> (1999), algunas de las más importantes aplicaciones son:

- Aceleración de reacciones: La cavitación acelera reacciones químicas y físicas;
- Mejora de procesos en minería: Mejora la flotación y extracción de minerales, como por ejemplo el carbón;

<sup>176</sup> III's Ultrasonics web (Berliner S., 1999): [//home.att.net/~Berliner-Ultrasonics/uson-3.html](http://home.att.net/~Berliner-Ultrasonics/uson-3.html)



- 
- Dispersión de partículas finas: Mejora en el análisis de distribución de partículas; mejora las pastas de cerámica utilizadas para aislamiento de condensadores electrónicos y porcelanas;
  - Homogenización: Aumenta la uniformidad de mezclas y suspensiones, empleándose en biotecnología y en el procesamiento de pulpa de papel;
  - Emulsificación: En el procesamiento de alimentos, medicamentos y cosméticos;
  - Disolución: Puede ser empleado para acelerar algunos ensayos en el control de calidad de medicamentos, sabores y fragancias;
  - Desgasificación: Remueve gases de disoluciones sin aplicación de vacío o calor, pudiendo ser empleado en el control de calidad de vinos y bebidas carbonatadas;
  - Limpieza de superficies y materiales porosos: Limpia la superficie de óxidos y remueve grasas sin aplicar disolventes a base de hidrocarburos.
  - Sonoquímica: genera nuevas especies hasta el momento imposibles de obtener por medios convencionales (calor, electricidad, luz, catálisis, etc.); optimiza los procesos de extracción de analitos.

Según Luque-García<sup>177</sup> (2003), en química analítica el uso de la radiación ultrasónica no es todavía una práctica común, sin embargo, ésta puede ser una herramienta muy valiosa y poderosa para acelerar

---

<sup>177</sup> Luque-García J.L., Luque de Castro M.D., *Ultrasound: a powerful tool for leaching*. Trends Anal. Chem. 22; 41-47, 2003

varias etapas en los procesos analíticos. Así, el ultrasonido podría prestar un gran auxilio durante el pretratamiento de muestras sólidas ya que facilita la extracción tanto de compuestos orgánicos<sup>178</sup> como compuestos inorgánicos<sup>179</sup> de sus respectivas matrices, también podría contribuir para facilitar la homogenización<sup>180</sup> de las muestras, la nebulización<sup>181</sup>, la dispersión<sup>182</sup>, el lavado<sup>183</sup> y la derivatización<sup>184</sup>. La extracción asistida por el ultrasonido tendría la capacidad de extraer un amplio número de analitos de distintos tipos de muestras. Su actuación se basaría en la capacidad de la energía ultrasónica para proporcionar altas temperaturas (que produce un aumento de la solubilidad y de la difusión) y altas presiones (que favorecería la penetración y transporte) en la interfase entre el disolvente (sea acuoso u orgánico) y la matriz sólida.

Actualmente se dispone de dos dispositivos para la producción del ultrasonido: el baño y la sonda ultrasónica<sup>185</sup>. A pesar de que los baños ultrasónicos son los más ampliamente utilizados, ellos presentan dos inconvenientes que contribuyen a disminuir la repetibilidad y reproducibilidad experimental, que son:

---

<sup>178</sup> Gómez-Ariza J.L., Morales E., Beltrán R., Giradles I., Ruiz-Benítez M., *Ultrasonic treatment of molluscan tissue for organotin speciation*. Analyst 120; 1171-1174, 1995

<sup>179</sup> Mierzwa J., Sun Y.C., Yang M.H., *Determination of Co and Ni in soils and river sediments by electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling*. Anal. Chim. Acta 355; 277-286, 1997

<sup>180</sup> Vinodgopal K., Peller J., Makogon O., Kamat P.V. *Ultrasonic mineralization of reactive textile azo dye, Remazol Black B*. Water Res. 32; 3646-3650, 1998

<sup>181</sup> Pack B.W., Ray S.J., Potyrailo R.A., Hieffje G.M., *Evaluation of ultrasonic nebulization for the analysis of transient samples: theoretical and practical considerations*. Appl. Spectrosc. 52; 1515-1521, 1998

<sup>182</sup> Wibetoe G., Takuwa D.T., Lund W., Sawula G., *Coulter particle analysis used for studying the effect of sample treatment in slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry*. Fresenius' J. Anal. Chem. 363; 46-54, 1999

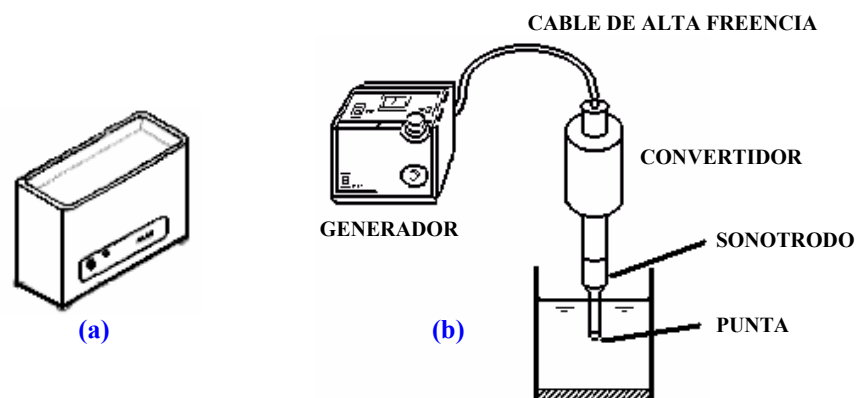
<sup>183</sup> Buldini P.L., Mevoli A., Sharma J.L., *LA-ICP-MS, IC and DPASV-DPCSV determination of metallic impurities in solar-grade silicon*. Talanta 47; 203-212, 1998

<sup>184</sup> Fransson B., Ragnarsson U., *Separation of enantiomers of  $\alpha$ -hydroxy acids by reversed-phase liquid chromatography after derivatization with 1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate*. J. Chrom. A 827; 31-36, 1998

<sup>185</sup> Soudagar S.R., Samant S.D., *Semiquantitative characterization of ultrasonic cleaner using a novel piezoelectric pressure intensity measurement probe*. Ultrason. Sonochem. 2; S49-S53, 1995

- La energía del ultrasonido no es dispensada uniformemente<sup>186</sup>, por lo que sólo una fracción del volumen total del líquido próximo a la fuente de ultrasonido sufre cavitación.
- Hay una reducción de la potencia de ultrasonido con el tiempo de forma que la energía suministrada al baño no es constante.

Así, en el caso de la utilización del ultrasonido a través del baño, se debe tener en cuenta que la cavitación producida dependerá de la disposición (vertical y horizontal) del frasco de reacción dentro del baño, de la temperatura del líquido, del volumen de líquido utilizado dentro del baño, del número de frascos utilizados simultáneamente, de la presencia de gas disuelto, entre otros factores<sup>187</sup>. En el empleo de las sondas ultrasónicas hay una clara ventaja: mayor capacidad de focalizar la energía, proporcionando una cavitación más eficiente en el líquido. Abajo se representa estos dos tipos de dispositivos capaces de producir ultrasonido:



**Figura 1.33** - Dispositivos de producción de ultrasonido: (a) Baño de ultrasonido; (b) Sonda ultrasónica

<sup>186</sup> Majumdar S., Senthil Kumar P., Pandit A.B., *Effect of liquid-phase properties on ultrasound intensity and cavitation activity*. Ultrason. Sonochem. 5; 113-118, 1998

<sup>187</sup> Berlan J., Mason T.J., *Sonochemistry: from research laboratories to industrial plants*. Ultrasonics 30; 203-212, 1992

En la sonda ultrasónica, el generador es la parte del aparato responsable de la transformación de la energía eléctrica (110 - 220 V con una frecuencia de 50 - 60 Hz) en una energía de alta frecuencia aplicada al convertidor, éste a su vez, está encargado de transformar esta energía en energía ultrasónica, que es un tipo de energía mecánica. El sonotrodo y su punta son las partes responsables de la dispensación de la radiación en un determinado medio. La eficiencia de esta transformación depende también de las condiciones relacionadas con la aplicación del ultrasonido. El efecto de la alta intensidad del ultrasonido depende de muchas variables, entre las que destacan: las características del medio de reacción (viscosidad, tensión superficial, presión de vapor, naturaleza y concentración de gas disuelto, presencia de partículas sólidas, etc.); parámetros del tratamiento (presión y temperatura); características del generador de ultrasonido (frecuencia, potencia); tamaño, naturaleza y geometría del frasco donde ocurre el tratamiento.

En la siguiente tabla se puede apreciar la aplicación del ultrasonido para la determinación de varios tipos de analitos en muestras de suelos, tanto con el empleo de la sonda ultrasónica como del baño de ultrasonido:

**Tabla 1.11** - *Distintas aplicaciones del ultrasonido*

<b>Ref.</b>	<b>Analito</b>	<b>Dispositivo de ultrasonido</b>	<b>Tiempo de extracción</b>
188	Metales pesados (Zinc; Arsénico)	sonda	10 minutos

<sup>188</sup> Marín A., López-Gonzálvez A., Barbas C., *Development and validation of extraction methods for determination of zinc and arsenic speciation in soils using focused ultrasound: Application to heavy metal study in mud and soils*. Anal. Chim. Acta 442; 305-308, 2001

Tabla 1.11 - Continuación

Ref.	Analito	Dispositivo de ultrasonido	Tiempo de extracción
189	Metales (trazas)	baño	9 minutos
190	Metales (Arsénico; Cadmio; Cobre)	baño	9 minutos
191	Metales (Cobre; Plomo; Zinc)	baño	4 horas
192	Compuestos organometálicos (Estaño, Mercurio, Plomo)	baño	4 minutos
193	Herbicida (Clorofenoxiácido)	baño	15 minutos
194	Insecticidas (Carbamato)	baño	15 minutos
195	Fungicidas	baño	20 minutos

<sup>189</sup> Väisänen A., Suontamo R., Silvonen J., Rintala J., *Ultrasound-assisted extraction in the determination of arsenic, cadmium, cooper, lead and silver in contaminated soil samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem. 373; 93-97, 2002

<sup>190</sup> Väisänen A., Suontamo R., *Comparison of ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted acid leaching and reflux for the determination of arsenic, cadmium and cooper in contaminated soil samples by electrothermal atomic absorption spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. 17; 739-742, 2002

<sup>191</sup> Al-Merey R., Al-Masri M.S., Bozou R., *Cold ultrasonic acid extraction of copper, lead and zinc from soil samples*. Anal. Chim. Acta 452; 143-148, 2002

<sup>192</sup> Huang J.H., Ilgen G., Matzner E., *Simultaneous extraction of organotin, organolead and organomercury species from soils and litter*. Anal. Chim. Acta 493; 23-34, 2003

<sup>193</sup> Rosales-Conrado N., León-González M.E., Pérez-Arribas L.V., Polo-Diez L.M., *Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient*. Anal. Chim. Acta 470; 147-154, 2002

<sup>194</sup> Sánchez-Brunete C., Rodríguez A., Tadeo J.L., *On-line preconcentration, ion chromatographic separation and spectrophotometric determination of palladium at trace level*. J. Chrom. A 1007; 93-100, 2003

<sup>195</sup> Sánchez-Brunete C., Miguel E., Tadeo J.L., *Multiresidue analysis of fungicides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and gas chromatography*. J. Chrom. A 976; 319-327, 2003

Tabla 1.11 - Continuación

Ref.	Analito	Dispositivo de ultrasonido	Tiempo de extracción
<sup>196</sup>	Compuestos orgánicos	baño	15 minutos
<sup>197</sup>	Herbicida (Ácido diclorofenoxiacético)	baño	60 minutos

### 7.1.1 - Extracción asistida por el ultrasonido *versus* otras técnicas

De acuerdo con Luque-García<sup>177</sup> (2003), la extracción asistida por el ultrasonido está actualmente experimentando un gran aumento, pasando de ser considerada solamente una novedosa técnica de extracción<sup>198</sup> y convirtiéndose en una de las técnicas de referencia en sustitución a otras<sup>199, 200</sup> ya existentes. A continuación se comentan algunas de las ventajas y desventajas de la extracción asistida por el ultrasonido en relación a otras técnicas más comúnmente utilizadas.

⇒ **Extracción por Soxhlet convencional:** Este método viene siendo empleado tradicionalmente como técnica de referencia. Las principales ventajas de la extracción asistida por el ultrasonido sobre el Soxhlet

<sup>196</sup> Buch A., Sternberg R., Meunier D., Rodier C., Laurent C., Raulin F., Vidal-Madjar C., *Solid-liquid extraction of amino and carboxylic acids for in situ analysis of the Martian soil*, J. Chrom. A 999; 165-174, 2003

<sup>197</sup> de Amarante O.P., Brito N.M., dos Santos T.C.R., Nunes G.S., Ribeiro M.L., *Determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis*. Talanta 60; 115-130, 2003

<sup>198</sup> Hechler U., Fischer J., Plagemann S., *Comparison of different extraction methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil*. Fresenius' J. Anal. Chem. 351; 591-592, 1995

<sup>199</sup> Fuoco R., Perla-Colombini M., Ceccarini A., *Analytical quality control for the determination of polychlorobiphenyls in environmental matrices*. Mikrochim. Acta 123; 175-183, 1996

<sup>200</sup> Berset J.D., Ejem M., Holzer R., Lischer P., *Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples*. Anal. Chim. Acta 383; 263-275, 1999

convencional son:

- Aumento en la eficiencia de la extracción, que puede ser similar<sup>198</sup> o superior<sup>201</sup> a la capacidad de extracción proporcionado por el Soxhlet convencional dado que el proceso de cavitación aumenta la polaridad del sistema, incluyendo la de extractantes, analitos y matriz.
- El tiempo del proceso de extracción suele ser más corto.
- Permite la extracción de analitos termolábiles, que ciertamente son alterados bajo las condiciones de extracción por Soxhlet.
- Puede permitir la adición de un coextractante para modificar la polaridad de la fase líquida<sup>202, 203</sup>.

Sin embargo, la extracción asistida por el ultrasonido presenta ciertas desventajas con respecto a la extracción por Soxhlet:

- La necesidad de filtrar y lavar después de la extracción lo que supone un mayor consumo de disolvente y un mayor riesgo de pérdidas y/o contaminación del extracto durante su manipulación.
- La extracción por Soxhlet suele ser más reproducible.

---

<sup>201</sup> Beard A., Naikwadi K., Karasek F.W., *Comparison of extraction methods for polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fly ash using gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chrom. 589; 265-270, 1992

<sup>202</sup> López-Avila V., Young R., Teplitsky N., *Microwave-assisted process as an alternative to soxhlet, sonication and supercritical fluid process*. J. AOAC Int. 79; 142-156, 1996

<sup>203</sup> Sporstoel S., Gjoes N., Carlberg G.E., *Extraction efficiencies for organic compounds in aquatic sediments*. Anal. Chim. Acta 151; 231-235, 1983

⇒ **Extracción por fluido supercrítico**: La extracción asistida por el ultrasonido ofrece las siguientes ventajas en relación a la extracción por fluido supercrítico (*SFE*):

- El aparato es mucho más sencillo, de modo que todos los costes del proceso de extracción son mucho menores.
- El uso del ultrasonido permite la extracción de una amplia variedad de compuestos, cualquiera que sea su polaridad, ya que puede emplear cualquier disolvente. Contrariamente, la *SFE* emplea CO<sub>2</sub> como extractante, casi que exclusivamente, restringiendo así su aplicación a compuestos apolares.

Sin embargo, la *SFE* supera el ultrasonido en los siguientes aspectos:

- La técnica de *SFE* es más simple y más rápida que algunos procedimientos de sonicación<sup>204</sup> utilizados.
- Al contrario de los extractantes típicamente empleados para la sonicación (ciclohexano, tetrahidrofurano y combinaciones binarias de diclorometano y acetona)<sup>200</sup>, el CO<sub>2</sub> supercrítico no es una sustancia que pueda acarrear un peligro y/o riesgo medioambiental.
- Frecuentemente, la técnica de *SFE* es más precisa que la del ultrasonido<sup>199</sup>, posiblemente debido al uso más generalizado del baño en vez de la sonda ultrasónica.

---

<sup>204</sup> Tena M.T., Valcárcel M., Hidalgo R.J., Ubeira J.L., *Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication*. Anal. Chem. 69; 523-526, 1997



⇒ **Extracción asistida por Microondas**: La extracción asistida por ultrasonido proporciona algunas ventajas interesantes sobre la extracción asistida por microondas, como las siguientes:

- El empleo del ultrasonido es, en algunas ocasiones, más rápido<sup>202</sup>.
- En digestiones ácidas, el procedimiento del ultrasonido es más seguro que el del microondas pues no requiere alta presión o alta temperatura<sup>205</sup>.
- En muchos casos, el procedimiento de ultrasonido es más sencillo, puesto que son necesarias menos operaciones y también porque son menos susceptibles a la contaminación.

Sin embargo, la extracción asistida mediante ultrasonido presenta algunos de los siguientes inconvenientes una vez comparada con la extracción asistida por el microondas:

- La extracción asistida por ultrasonido frecuentemente es menos robusta, ya que con el tiempo, la superficie de la punta de la sonda ultrasónica se altera, modificando la eficiencia<sup>206</sup> de extracción.
- El tamaño de partícula es un factor crítico en aplicaciones<sup>205</sup> con ultrasonido.

---

<sup>205</sup> Filgueiras A.V., Capelo J.L., Lavilla I., Bendicho C., *Comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted digestion for determination of magnesium, manganese and zinc in plant samples by flame atomic absorption spectrometry*. Talanta 53; 433-441, 2000

<sup>206</sup> Kodba Z.C., Marcel J., *Microwave assisted extraction and sonication of polychlorobiphenils from river sediments and risk assesment by toxic equivalency factors*. Chromatographia 49; 21-27, 1999

Finalmente, concluye Luque-García<sup>177</sup> (2003), que la extracción asistida por ultrasonido está demostrando que es una técnica efectiva de extracción y una alternativa eficiente, barata y rápida respecto a otras técnicas, para una amplia variedad de analitos en distintos tipos de matrices sólidas. Debido a sus ventajas y su facilidad para la automatización, presenta un futuro prometedor. Esencialmente, sobre su baja precisión, esto es debido al uso difundido del baño, donde la distribución de energía ultrasónica no es uniforme, además de haber muchas pérdidas. No obstante, estos inconvenientes pueden ser evitados por el uso de la sonda ultrasónica.

## 7.2 - Extracción en Fase Sólida

El proceso de tratamiento de muestras más complejas, que presentan gran cantidad de interferencias y necesitan niveles de detección muy bajos, comenzó a desarrollarse mediante la aparición de técnicas de preconcentración por extracción sólido-líquido con materiales adsorbentes. La introducción del uso de adsorbentes comerciales para extraer y purificar los analitos en disolución supuso un gran paso, ya que la utilización de esta técnica permite aislar, purificar y preconcentrar con éxito compuestos químicos de manera rápida y reproducible. Además, la extracción en fase sólida (*SPE*) no sólo evita las molestas emulsiones que se generan en muchos de los procesos de extracción líquido-líquido, sino que también es considerada una técnica sencilla, económica y que consume una cantidad considerablemente menor de disolvente orgánico. Desde su primera aplicación en los años 50, la expansión de la *SPE* ha sido imparable, llegando a ser hoy en día una de las más utilizadas. Esto ha sido debido a la comercialización de formatos que han permitido la automatización del proceso y a la síntesis de nuevos adsorbentes que han incrementado tanto la selectividad de la extracción como las posibles

aplicaciones<sup>207</sup>.

### 7.2.1 - Fundamento de la Extracción en Fase Sólida

La *SPE* es una técnica de preparación de muestra que limpia y/o concentra muestras antes del análisis y, puede ser empleada de dos formas distintas:

- 1) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los interferentes mientras que los analitos eluyen (menos común);
- 2) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos y, posiblemente, algunos interferentes. Estos se eliminan del lecho y después se eluyen los analitos. La elución puede ser realizada con un pequeño volumen de disolvente para concentrar la muestra, aumentando los límites de detección y simplificando el análisis (más común).

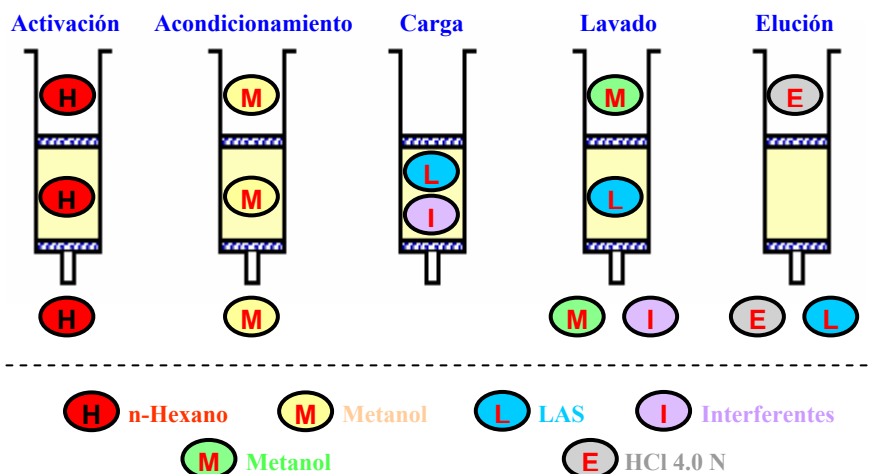
Para su aplicación práctica se emplean dispositivos comerciales que contienen entre 50 y 1000 mg de partículas porosas. Cuando la disolución que contiene los analitos pasa a través del adsorbente activado, se produce una retención de éstos junto con compuestos interferentes de los diferentes tipos de muestras<sup>208</sup>. Seguidamente se realiza una etapa de lavado con la que se pretende desorber los interferentes que hayan podido quedar retenidos. Finalmente, los compuestos de interés se eluyen mediante el paso del volumen necesario de una disolución adecuada.

---

<sup>207</sup> Hennion M.C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. J. Chrom. A 856; 3-54, 1999

<sup>208</sup> Hagen D., Markell C., Schmitt G., Blevins D., *Membrane approach to solid-phase extractions*. Anal. Chim. Acta 236; 157-164, 1990

Abajo se representa un esquema del procedimiento de la *SPE*:



**Figura 1.34** - *SPE* para la purificación del extracto metanólico de LAS con una columna conteniendo una sal de amonio cuaternaria (*SAX*)

La naturaleza química de los materiales empleados en *SPE* es similar a la de los utilizados en Cromatografía Líquida. Es por ello que el proceso de extracción en fase sólida se puede considerar como una cromatografía de baja resolución llevada a cabo en dos situaciones extremas: retención máxima de los analitos durante el paso de la muestra y retención mínima durante la elución.

El formato más común de los dispositivos comercializados para aplicar la *SPE* se introdujo a finales de los años 70, y consiste en columnas fabricadas principalmente en polipropileno. El adsorbente se mantiene fijo gracias a dos fritados que normalmente son partículas de polipropileno sinterizadas. El tamaño de las partículas, está entre 40 y 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, es tal que permite el paso de líquidos con una ligera succión. Este formato presenta sin embargo ciertos problemas si el volumen de muestra es elevado o si contiene partículas en suspensión. Para solventar estos inconvenientes, a principios de

los años 90 se introdujo la utilización de discos<sup>209</sup>, de aproximadamente 0.5 mm de grosor y entre 4 y 96 mm de diámetro. La demanda creciente de dispositivos adecuados con objeto de permitir el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, originó en 1997, el diseño del formato de 96 pocitos<sup>210</sup>. En este dispositivo, cada pocito contiene un pequeño disco o un minicartucho, con menos de 50 mg de material adsorbente. Por lo tanto, el volumen de eluyente es mínimo, entre 100 y 200  $\mu\text{L}$  de disolvente.

Una posibilidad interesante que ofrece la *SPE* es la de llevar a cabo el proceso de extracción en línea con el de análisis mediante Cromatografía Líquida, lo que se consigue utilizando precolumnas. De esta manera no es necesario manipular la muestra para su inyección, lo que reduce las posibilidades de contaminación y pérdidas producidas por las transferencias.

### 7.2.2 - Tipos de adsorbentes

La selectividad de la *SPE* está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Por lo tanto, las propiedades del adsorbente están relacionadas y absolutamente implicadas con la estructura química del analito y/o la composición de la matriz de la muestra. Así que una sustancia sólida con una fuerte afinidad hacia compuestos orgánicos puede retener y concentrar este tipo de compuestos, cuando están presentes en las muestras, existiendo muchas fases sólidas específicas para la extracción de diferentes grupos de compuestos orgánicos con varios grados de selectividad, este factor ha de ser optimizado mediante la elección de la fase estacionaria más adecuada.

---

<sup>209</sup> Markell C., Hagen D.F., Bunnelle V.A., *New technologies in solid-phase extraction*. LC-GC 9; 332-337, 1992

<sup>210</sup> Wells D. A., *96-Well plate products for solid-phase extraction*. LC-GC 17; 600-616, 1999

Los materiales utilizados en *SPE* tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial. Los más comúnmente utilizados son sílice o resinas poliméricas, los cuales pueden modificarse mediante la introducción de diferentes grupos funcionales.

También existen los denominados adsorbentes de acceso restringido, que permiten únicamente el paso de moléculas pequeñas. Además, en los últimos años se han introducido en el mercado otro tipo de adsorbentes que permiten una elevada selectividad en la extracción. Estos materiales, basados en el reconocimiento molecular, consisten en anticuerpos inmovilizados y en polímeros de huella molecular. Abajo se verifica algunos ejemplos de fase sólida:

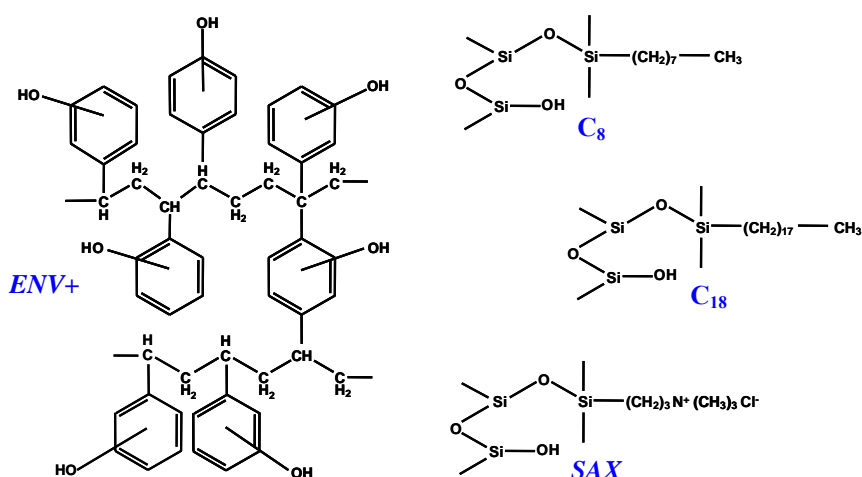


Figura 1.35 - Distintos tipos de fase sólida usados en SPE

Para el caso del *LAS*, se han utilizado tradicionalmente los adsorbentes síliceos. Este tipo de adsorbente consiste en un gel de sílice, el cual puede modificarse mediante la unión covalente a los grupos silanol de diferentes grupos funcionales, bien de naturaleza polar, apolar, iónica o mixta (apolar + iónica). Dependiendo por tanto de la funcionalidad del adsorbente,

los mecanismos de retención son distintos.

Fases conteniendo  $C_{18}$ , es decir, con un cadena alquílica compuesta por 18 carbonos (-octadecilo) unido covalentemente a los grupos silanoles, son frecuentemente empleadas, donde su mecanismo de interacción se basa en establecer uniones de naturaleza apolar con los analitos de interés, pero también se pueden encontrar algunos estudios que utilizan otras como  $C_8$ , con cadena alquílica compuesta por 8 carbonos (-octilo);  $C_2$ , con cadena alquílica compuesta por 2 carbonos (-etilo); *SAX* (intercambiadora aniónica - sal de amonio cuaternaria covalentemente ligada a la superficie de la partícula de sílice); etc., sin embargo, las fases estacionarias conteniendo sustancias hidrófobas como  $C_{18}$  y  $C_8$  presentan ciertos inconvenientes como puede ser la coextracción de sustancias aromáticas como los ácidos húmicos en muestras de aguas superficiales y la coextracción de tensioactivos no iónicos (Nonilfenol polietoxilados) en muestras de aguas residuales, pudiendo, quizás, interferir con el análisis cromatográfico del *LAS*. Estas dificultades aumentan cuanto menor es la cantidad del analito, sobre todo en muestras de aguas superficiales. En estos casos, hay que realizar una limpieza antes del análisis del *LAS*, posiblemente mediante un cartucho con una fase estacionaria intercambiadora aniónica<sup>106</sup>.

Algunos estudios realizados también usan una segunda limpieza con un cartucho  $C_{18}$ <sup>211</sup>; o invierten el orden de empleo de los cartuchos, o incluso utilizan 3 cartuchos:  $C_8$ , *SAX*,  $C_8$ <sup>212</sup>. Fujita<sup>121</sup> *et al.*, utilizó un gradiente de elución con cartucho  $C_{18}$  a fin de eliminar los interferentes más polares antes de la elución del *LAS*. La coextracción de compuestos orgánicos

<sup>211</sup> Schöberl P., Klotz H., Spilker R., Nitschke L., *LAS monitoring*. Tenside Surf. Det. 31; 243-252, 1994

<sup>212</sup> Matthijs E., Stalmans M., *Monitoring of LAS in the North Sea*. Tenside Surf. Det. 30; 29-33, 1993

menos polares puede ser disminuida utilizando una fase sólida menos hidrófoba como los cartuchos  $C_2$ <sup>106</sup>, pero se afecta la recuperación de *LAS*.

Un procedimiento alternativo fue presentado por Marcomini & Giger<sup>122</sup> donde se realiza una optimización de la separación cromatográfica llevando a cabo la coextracción de tensioactivos no iónicos en aguas residuales, paralelamente a la determinación de *LAS*.

Entre las aplicaciones descritas en la literatura, el uso de adsorbentes de sílice para la purificación del *LAS* en muestras medioambientales es muy frecuente, pudiéndose encontrar esta aplicación en los siguientes estudios:

**Tabla 1.12** - Distintos tipos de adsorbente a base de sílice de SPE para la purificación del *LAS* en matrices medioambientales

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
25	Vegetales	$C_8 + SAX + C_8$	HPLC-FLD
75	Agua de río	$C_{18}$	HPLC-FLD
93	Matrices acuosas, sedimento, lodo y suelo	$SAX + C_8$	HPLC-UV
99	Agua y sedimento de río, aguas residuales	$C_8$	GC-MS
105	Sedimento de lago	$C_{18}$	GC-MS
106	Muestras acuosas	$C_2 + SAX$	HPLC-FLD



Tabla 1.12 - Continuación

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
110	Agua y sedimento marino; agua de estuario	C <sub>18</sub> + SAX	HPLC-FLD
121	Agua de río	C <sub>18</sub>	HPLC-UV/Vis
134	Agua y sedimento de río; agua residual	C <sub>18</sub>	HPLC-UV
137	Agua y sedimento marino	C <sub>18</sub> + SAX	HPLC-FLD
146	Organismos marinos	C <sub>18</sub>	HPLC-FLD
147	Agua y sedimento marino	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
149	Sedimento marino	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
150	Agua y sedimento marino	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
151	Sedimento y agua de río, marina; agua de presa	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
153	Sedimento de río	C <sub>18</sub>	HPLC-FLD
154	Agua y sedimento de río	C <sub>18</sub>	GC-MS
155	Suelo	SAX + C <sub>8</sub>	HPLC-FLD
159	Suelo	C <sub>18</sub>	HPLC-MS

Tabla 1.12 - Continuación

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
161	Sedimento de lago	C <sub>18</sub>	HPLC-UV
163	Lodo	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
211	Agua de río	C <sub>18</sub> + C <sub>18</sub>	HPLC-FLD
212	Agua marina	C <sub>8</sub> + SAX + C <sub>8</sub>	HPLC-FLD
213	Agua de río	SAX	HPLC-FLD
214	Lodo	C <sub>18</sub> + SAX	HPLC-FLD
215	Agua de pozo; aguas residuales	C <sub>18</sub>	HPLC-FLD
216	Lodo, suelo, sedimento	SAX + C <sub>8</sub>	HPLC-UV
217	Agua y sedimento marino; pescado	C <sub>18</sub>	HPLC-FLD

<sup>213</sup> Yokoyama Y., Sato H., *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of LAS in river water at ppb levels by precolumn concentration*. J Chrom. 555; 155-162, 1991

<sup>214</sup> Temmink H., Klapwijk B., *Fate of LAS in activated sludge plants*. Water Res. 38; 903-912, 2004

<sup>215</sup> del Olmo M., Garbalo A., Nimer M., López I., de Ferrer J.A., Vilchez J.L., *Development of methodologies for different degrees of resolution of LAS in groundwater and wastewater by Liquid Chromatography using sodium dodecyl sulphate*. Chromatographia 60; 157-164, 2004

<sup>216</sup> De Henau H., Matthijs E., Hopping W. D., *Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in sewage sludges, soils and sediments: analytical determination and environmental safety considerations*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 26; 279-293, 1986

<sup>217</sup> M. Kikuchi M., Tokai A., Yoshida T., *Determination of trace levels of LAS in the marine environment by high-performance liquid chromatography*. Water Res. 20; 643-650, 1986

Tabla 1.12 - Continuación

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
218	Muestras acuosas	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
219	Aguas superficiales	C <sub>18</sub>	HPLC-MS
220	Muestras acuosas	C <sub>18</sub> + SAX	HPLC-FLD
221	Muestras acuosas	C <sub>18</sub>	HPLC-UV
222	Agua marina	C <sub>18</sub> + SAX	HPLC-FLD
223	Aguas residuales	C <sub>18</sub>	HPLC-MS

También se han empleado cartuchos con fase sólida polimérica. En vez de fases estacionarias con base de sílice + fase inversas, Di Corcia<sup>120</sup> *et al.*, utilizó una fase estacionaria compuesta por carbón desactivado (GCB -

<sup>218</sup> Eichhorn P., Rodrigues S.V., Baumann W., Knepper T.P., *Incomplete degradation of LAS surfactants in Brazilian surface waters and pursuit of their polar metabolites in drinking waters*. Sci. Total Environ. 234; 123-134, 2002

<sup>219</sup> Eichhorn P., Flavier M.E., Paje M.L., Knepper T.P., *Occurrence and fate of linear and branched alkylbenzenesulfonates and their metabolites in surface waters in the Philippines*. Sci. Total Environ. 269; 75-85, 2001

<sup>220</sup> Scullion S.D., Clench M.R., Cooke M., Ashcroft A.E., *Determination of surfactants in surface water by solid-phase extraction, liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chrom. A 733; 207-216, 1996

<sup>221</sup> Conrad A., Cadoret A., Corteel P., Leroy P., Block J.-C., *Adsorption/desorption of LAS and azoproteins by/from activated sludge flocs*. Chemosphere 62; 53-60, 2006

<sup>222</sup> León V.M., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates in seawater*. Environ. Sci. Technol. 38; 2359 -2367, 2004

<sup>223</sup> Farré M., Ramón J., Galve R., Marco M.-P., Barceló D., *Evaluation of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay for determination of linear alkyl benzenesulfonates in wastewater treatment plants*. Environ. Sci. Technol. 40; 5064-5070, 2006

intercambiadora aniónica e hidrófoba) para la extracción de *LAS*, que proporciona una interacción específica con aniones orgánicos debido a sitios positivamente cargados en su superficie. De este modo el *LAS* puede ser específicamente extraído con recuperación de un 91 - 96%, sin necesitar una limpieza de la muestra antes del análisis. Sin embargo, debido al número limitado de cargas positivas en su superficie, estos cartuchos se sobrecargan fácilmente<sup>120</sup>. El procesamiento de *LAS* visando su concentración en *XAD*-resinas<sup>101, 224</sup> (resinas amberlita compuestas de polímeros que pueden presentar distintos mecanismos de adsorción en función de la característica de su polímero, encontrando resinas poliméricas intercambiadoras iónicas, apolares, polares o incluso presentando dos propiedades) o un intercambiador aniónico débil<sup>225</sup> ya fue realizado. Field *et al.*<sup>225</sup> empleó un procedimiento de aislamiento/limpieza bastante complejo para la determinación de *LAS*, sulfonatos de dialquiltetralina (*DATS*, del inglés *Dialkyltetralin sulfonates*), y sulfofenil carboxilatos (*SPC*) en agua subterránea. Para esta finalidad fue necesario el uso de varias etapas de purificación por medio del empleo de *SPE* con la utilización de fases estacionarias poliméricas con distintas propiedades (apolares, iónicas).

La introducción de los adsorbentes poliméricos permitió ampliar el intervalo de pH de trabajo. El polímero introducido por primera vez en el campo del tratamiento de muestra consistió en el poliestireno divinilbenceno (*PS-DVB*) altamente entrecruzado. La elevada hidrofobicidad de este copolímero hacía imprescindible una etapa de acondicionado y un control riguroso para evitar su secado. La

---

<sup>224</sup> Taylor P.W., Nickless G., *Paired-ion high-performance liquid chromatography of partially biodegraded linear alkylbenzenesulphonate*. J.Chrom. A 178; 259-269, 1979

<sup>225</sup> Field J.A., Leenheer J.A., Thorn K.A., Barbar L.B.I., Rostad C., Macalady D.L., Daniel S.R., *Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater*. J. Contam. Hydrol. 9; 55-78, 1992

introducción de grupos polares (hidroxilo, acetilo, etc.) ha permitido aumentar el carácter hidrofílico del polímero así como, la utilización de copolímeros de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona han permitido eliminar la etapa de acondicionamiento<sup>226</sup>.

En el caso del análisis de *LAS* en matrices medioambientales y/o patrones, los adsorbentes poliméricos han sido menos utilizados que los adsorbentes a base de sílice, y se puede encontrar cartuchos con tipos distintos de polímeros, como los copolímeros de estireno de divinilbenceno: *ENV+* (hidroxilado); *XAD-2*; *XAD-4*; *Sep-Pak plus PS-2*; con carbono grafitizado: *GCB*.

A continuación se recogen algunos estudios empleando estos tipos de adsorbentes:

**Tabla 1.13** - Distintos tipos de adsorbente polimérico de SPE para la purificación del *LAS* en matrices medioambientales

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
108	Aguas residuales brutas y tratadas; lodos	<i>ENV+</i>	HPLC-MS
111	Aguas industriales	<i>ENV+</i>	HPLC/ESI-MS
227	Aguas residuales	<i>ENV+</i>	HPLC-MS

<sup>226</sup> Bouvier E.S.P., Martin D.M., Iraneta P.C., Capparella M., Cheng Y.-F., Phillips D.J., *A novel polymeric reversed phase sorbent for solid-phase extraction*. LC-GC. 15; 152-162, 1997

<sup>227</sup> Huang Y., LaTorre A., Barceló D., Garcia J., Aguirre P., Mujeriego R., Bayona J.M., *Factors Affecting LAS Removal in Subsurface Flow Constructed Wetlands*. Environ. Sci. Technol. 38; 2657 -2663, 2004

Tabla 1.13 - Continuación

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
228	Aguas residuales industriales	ENV+	HPLC/ESI-MS
229	Agua de río	Sep-Pak plus PS-2	HPLC/ESI-MS
101	Aguas residuales, Agua de río	XAD-2	GC-FID
224	Patrones	XAD-4	HPLC-UV
115	Agua residuales industriales	GCB	HPLC-UV
120	Matrices acuosas	GCB	HPLC-FLD
139	Suelo	GCB	HPLC-FLD
230	Agua de río	GCB	GC-MS
231	Muestras acuosas	GCB	HPLC-FLD

<sup>228</sup> Castillo M., Alonso M.C., Riu J., Barceló D., *Identification of Polar, Ionic, and Highly Water Soluble Organic Pollutants in Untreated Industrial Wastewaters* Environ. Sci. Technol. 33; 1300-1306, 1999

<sup>229</sup> Nishigaki A., Kuroiwa C., Shibukawa M., *Characterization and Determination of LAS in Environmental Water Samples by HPLC with a Hydrophilic Polymer Column and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection*. Anal. Sci. 20; 139-142, 2004

<sup>230</sup> Ding W.H., Tzing S.-H., Lo J.H., *Ocurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river waters of Taiwan*. Chemosphere 38; 2597-2606, 1999

<sup>231</sup> Di Corcia A., Samperi R., Marcomini A., *Monitoring Aromatic Surfactants and Their Biodegradation Intermediates in Raw and Treated Sewages by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography*. Environ. Sci. Technol. 28; 850-858, 1994

Tabla 1.13 - Continuación

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
232	Aguas residuales; Agua de río	GCB	HPLC-FLD

Recientemente, también se ha recurrido al uso de nuevos adsorbentes compuestos por agregados supramoleculares. Estos están formados por tensioactivos iónicos adsorbidos en la superficie de óxidos de metal tales como la alúmina, la sílice, el bióxido de titanio y el oxihidróxido férrico, denominándose hemimicelas y admicelas, que presentan un alto potencial para ser utilizados como materias de adsorbentes en *SPE*<sup>233</sup>. Las hemimicelas están constituidas por monocapas de tensioactivos adsorbidos en la superficie del óxido que se encuentran con cargas opuestas, mientras que las admicelas tienen una estructura de doble capa con la superficie exterior compuesta del grupo iónico de la cabeza del tensioactivo y la parte interior con la cadena hidrocarbónica (*Figura 1.18*). Así, por este mecanismo, las hemimicelas serían responsables por interacciones relacionadas entre las cadenas alquílicas y las admicelas entre los grupos polares. Evidentemente, para la determinación del *LAS*, el tensioactivo empleado para la formación del agregado hemimicela/admicela debería ser de naturaleza catiónica (bromuro de cetiltrimetilamonio o cloruro de cetilpiridinio) en sílice<sup>234</sup>. Estos nuevos tipos de adsorbentes presentan como ventajas una alta eficiencia de

<sup>232</sup> Di Corcia A., Capuani, L., Casassa F., Marcomini A., Samperi R., *Fate of Linear Alkyl Benzenesulfonates, Coproducts, and Their Metabolites in Sewage Treatment Plants and in Receiving River Waters*. Environ. Sci. Technol. 33; 4119-4125, 1999

<sup>233</sup> Rubio S., Pérez-Bendito D., *Supramolecular assemblies for extracting organic compounds*. Trends Anal. Chem. 22; 470-485, 2003

<sup>234</sup> Lunar L., Rubio S., Pérez-Bendito D., *Analysis of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) homologues from environmental water samples by mixed admicelle-based extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. Analyst 131; 835-841, 2006

extracción, fácil elución de los analitos, permiten un alto flujo en la etapa de carga y un mayor volumen de ruptura. En literatura, solamente se encuentra un artículo que ha empleado este tipo de adsorbente para el análisis del LAS, como se puede observar en la siguiente tabla:

**Tabla 1.14 - Empleo de SPE con hemimicelas/admicelas**

Ref.	Matriz	SPE	Separación y Detección
234	Aguas residuales	Hemimicela/Admicela	HPLC-MS

## **8 - ASPECTOS TEÓRICOS INFLUYENTES EN LA MOVILIDAD DE UN COMPUESTO**

En este apartado, se van a considerar los aspectos teóricos más relevantes e influyentes en la movilidad del LAS, sobre todo los que afectan tanto a la adsorción como al transporte de solutos.

### **8.1 - Adsorción**

A continuación se describen los aspectos más comúnmente encontrados y relacionados con este fenómeno.

#### **8.1.1 - Generalidades**

La adsorción es el proceso por el que una determinada especie química (adsorbida o adsorbato) presente en una fase fluida en contacto con una fase condensada (líquida o sólida) denominada adsorbente, se concentra en la interfase de esta última.



Se suelen distinguir dos tipos<sup>235</sup> de adsorción:

⇒ **Adsorción física o fisisorción:**

1. Calor de adsorción inferior a  $10 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
2. La adsorción se produce a temperaturas moderadas.
3. Los incrementos en la cantidad de sustancia adsorbida son más amplios a medida que se amplían los incrementos de presión del gas que se adsorbe.
4. La cantidad de adsorción sobre una superficie depende más de la sustancia que se adsorbe que del adsorbente.
5. No se aprecia energía de activación en el proceso de adsorción.
6. Se forman capas múltiples.

⇒ **Adsorción química o quimisorción:**

1. Calor de adsorción superior a  $10 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
2. La adsorción se produce a elevadas temperaturas.
3. Los incrementos en la cantidad de sustancia adsorbida son menores a medida que se amplían los incrementos de presión del gas que se adsorbe.
4. El proceso de adsorción depende a la vez de la sustancia que se adsorbe y del adsorbente.
5. Se manifiesta energía de activación en el proceso de adsorción.
6. La adsorción da lugar, a lo sumo, a una monocapa.

<sup>235</sup> Ruthven D.M., *Principles of adsorption and desorption processes*. Ed. John Wiley & Sons, New York, USA, p. 433, 1984

### 8.1.2 - Factores que intervienen en los procesos de adsorción

La distribución de un soluto entre una fase sólida y otra líquida está controlada por varios factores, entre los que se pueden citar:

- Propiedades del adsorbato.
- Propiedades de los materiales adsorbentes (suelo).
- Condiciones del medio.
- Características de la fase líquida en contacto con el adsorbente.

#### 8.1.2.1 - Propiedades del Adsorbato

Las principales propiedades del adsorbato que pueden participar en el proceso de adsorción son: la estructura electrónica de la molécula, la facilidad para ionizarse, el volumen molecular y la solubilidad de la molécula en agua.

⇒ La estructura condiciona la naturaleza de los enlaces que se establecen con la superficie de las partículas del suelo. Así, se puede distinguir entre moléculas con estructura iónica y moléculas con estructura covalente polar y no polar. Las moléculas con estructura iónica se fijan principalmente por mecanismos de intercambio catiónico o por interacciones multipolares con la superficie del sólido. En el caso de moléculas neutras, las uniones tienen lugar por puentes de hidrógeno.

⇒ Ionización de las moléculas: algunas moléculas orgánicas se pueden

disociar completamente y dan lugar a aniones con carácter de ácido fuerte, o cationes con carácter de base fuerte. Estos iones pueden ser fijados con uniones muy energéticas, como los enlaces iónicos.

⇒ *Volumen molecular*: el tamaño de la molécula puede llegar a ser el factor limitante de la adsorción, al permitir o impedir su acceso a los poros del material adsorbente.

⇒ *La solubilidad* de la molécula en agua.

### 8.1.2.2 - Propiedades del Adsorbente

Las propiedades del suelo son complementarias de las del adsorbato y pueden influir notablemente en la velocidad y la capacidad de adsorción del mismo. Toda la superficie del suelo puede actuar como adsorbente; sin embargo, el tamaño de las partículas del suelo, la superficie específica, etc. son propiedades que tienen una influencia considerable en los procesos de adsorción. A este respecto, las características más importantes del suelo son el contenido en arcillas, en materia orgánica y en óxidos e hidróxidos<sup>236, 237</sup>.

#### A) Arcillas

Las características principales de las arcillas son su tamaño reducido de partícula, la presencia de carga en su superficie y su gran capacidad de intercambio de iones, lo cual le otorga propiedades físico-químicas muy particulares, con una decisiva influencia en el proceso de adsorción.

---

<sup>236</sup> Appelo C.A.J., Postma D., *Geochemistry, groundwater and pollution*. Ed. A. A. Balkema. Rotterdam, Netherlands, p. 536, 1993

<sup>237</sup> Langmuir D., *Aqueous environmental geochemistry*. Ed. Prentice Hall, Coop. New Jersey, USA, p. 600, 1997

La presencia de cargas produce la atracción de sustancias presentes en la solución en contacto con las partículas arcillosas. Estos minerales presentan cargas con dos orígenes diferentes: *permanentes* y *dependientes del pH*. Las cargas permanentes, constantes o estructurales, se generan por sustituciones isomórficas en las estructuras cristalinas, generalmente negativas, debido al reemplazo de átomos de la estructura por otros de menor valencia (magnesio por aluminio, aluminio por silicio). Estas cargas resultan independientes del entorno del mineral. En los bordes, sin embargo, aparecen cargas variables que dependen del pH del medio y que se generan por la disociación de grupos superficiales. Estas cargas sólo se encuentran neutralizadas en un determinado valor del pH, denominado pzc (punto de carga cero o isoelectrico = *point of zero charge*), que depende del tipo de enlace químico involucrado. Cuando el pH se eleva por encima del pzc, en un medio más alcalinizado, la superficie adquiere carga negativa ( $\text{pH} > \text{pzc}$ ), mientras que al descender por debajo del pzc, en un medio más ácido, se vuelve positiva. Esto no implica que el valor de pzc sea neutro, sino que depende del grupo funcional involucrado y puede ser ácido o alcalino<sup>236, 237</sup>.

En consecuencia, la capacidad de intercambio está muy relacionada con el pH del medio. En minerales de tipo montmorillonítico, las sustituciones isomórficas generan cargas permanentes negativas, mientras que, en otro tipo de arcillas, el pH del medio conduce al desarrollo de cargas en la superficie, que pueden ser negativas ( $\text{pH} > \text{pzc}$ ), positivas ( $\text{pH} < \text{pzc}$ ) o neutras ( $\text{pH} = \text{pzc}$ ). Las cargas presentes definirán el tipo de iones que se adsorberán sobre la superficie. Cuando prevalecen superficies cargadas negativamente, son los cationes los que tenderán a acercarse a ellas. Se forman así los cationes intercambiables, aunque no siempre esto pueda suceder, ya que un catión es intercambiable siempre y cuando pueda ser sustituido por otro. Los cationes orgánicos, que son atraídos sobre la superficie por fuerzas electrostáticas y

también por fuerzas de Van Der Waals, son capaces de desplazar a los cationes inorgánicos que se encuentren en el sistema<sup>236, 237</sup>.

## **B) Materia orgánica**

En la materia orgánica del suelo están representados compuestos húmicos y no húmicos. Estos últimos están constituidos por residuos vegetales en vía de descomposición y comprenden productos de peso molecular muy variable y de naturaleza química bien definida: proteínas, aminoácidos, lípidos y ácidos.

Los compuestos húmicos, por su parte, están constituidos por ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina y todos poseen los mismos grupos funcionales: carboxilo, alcohol y fenol.

Las funciones ácido permiten que las moléculas orgánicas puedan ser adsorbidas por interacciones iónicas o por uniones catión-dipolo.

## **C) Óxidos e hidróxidos**

Los óxidos e hidróxidos amorfos libres de hierro y aluminio pueden presentar cargas positivas, debidas a los agrupamientos del tipo  $\text{Al(OH)}_x^+$  y  $\text{Fe(OH)}_x^+$ , que dan lugar a la adsorción de los aniones. Los hidróxidos de aluminio se encuentran frecuentemente recubriendo las superficies de la arcilla.

### **8.1.2.3 - Condiciones del medio**

Entre las condiciones del medio que pueden alterar el fenómeno de

adsorción, se encuentran:

### A) Temperatura

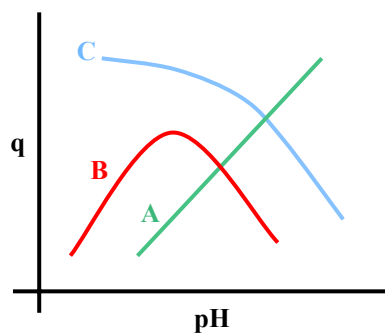
La temperatura tiene sobre la adsorción una influencia muy variable, que depende de la naturaleza de los materiales adsorbentes y de los adsorbatos.

### B) Composición de la fase líquida en contacto con el adsorbente

La composición de la fase líquida tiene gran importancia: puede disminuir la superficie accesible a las moléculas de solutos, establecer puentes de agua entre el adsorbente y el adsorbato o competir con éste por los lugares de adsorción.

### C) pH

La influencia de la variación de la acidez del medio depende a la vez de la naturaleza del adsorbato y de la del adsorbente. En la **Figura 1.36** se observan distintos efectos que el pH produce en la cantidad adsorbida:



**Figura 1.36** - Variación de la adsorción con el pH del medio (*q* expresa la masa de soluto adsorbida por masa de suelo)

En algunos casos, la adsorción presenta un valor máximo (curva **B**) a un valor de pH generalmente próximo al del pKa de la molécula adsorbida. Las curvas del tipo **A** se presentan generalmente en el caso de que la adsorción de adsorbato con carácter de base débil tenga lugar sobre moléculas neutras, mientras las curvas del tipo **B** y **C** aparecen en tres circunstancias:

- Adsorción de moléculas con carácter de base débil sobre adsorbentes con carga eléctrica negativa.
- Adsorción de moléculas con carácter de ácido débil sobre adsorbentes con carga eléctrica positiva.
- Adsorción de moléculas neutras sobre arcillas.

### 8.1.3 - Cinética de adsorción

El proceso de adsorción puede considerarse constituido por un conjunto de etapas generalmente sucesivas, aunque algunas de ellas pueden tener lugar simultáneamente. Estas etapas son:

- Transferencia de las moléculas desde el fluido a la superficie externa de las partículas sólidas.
- Difusión de las moléculas por el interior de los poros hasta los centros activos de sus superficies; esta etapa engloba realmente dos mecanismos diferentes: uno de difusión ordinaria de las moléculas del adsorbato en el fluido que ocupa los poros de las partículas del adsorbente y otro de migración de dichas moléculas una vez

adsorbidas sobre la superficie de los poros.

- Adsorción sobre la superficie del sólido.

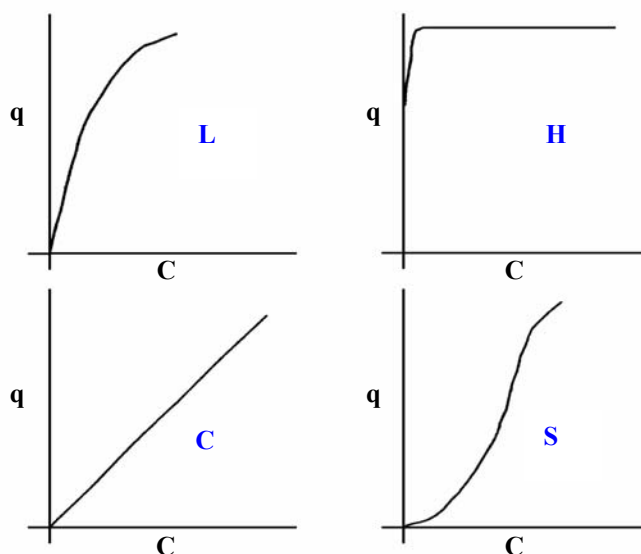
Una o varias de las etapas mencionadas pueden ser, comparativamente, más lentas que las otras, por lo que ejercen de etapa controladora del proceso de adsorción. Así, si existe una importante resistencia a la transferencia de materia en la fase fluida dentro o fuera de los poros, las etapas que ejercen el control son las difusionales, mientras que, si la cinética de adsorción sobre la superficie no es suficientemente rápida, la etapa de adsorción constituye el principal control del proceso.

#### **8.1.4 - Equilibrio de adsorción**

El equilibrio de adsorción a una temperatura dada está determinado por las isothermas de adsorción, que describen la relación entre la cantidad de sustancia que es adsorbida por la fase sólida del suelo y la cantidad que está en la solución en equilibrio. Estas isothermas se obtienen mediante técnicas experimentales en discontinuo, denominadas "*batch*", en una suspensión de suelo agitado continuamente. Esta situación se supone representada adecuadamente mediante un modelo físico constituido por un sistema de partículas de suelo completamente disperso en la fase líquida, donde toda la superficie de las partículas está disponible para la interacción con los solutos. Varios factores, aparte de la naturaleza del suelo y de la temperatura, pueden influir en la adsorción: el tiempo de contacto suelo-disolución, el método de agitación, la relación suelo/disolución, la naturaleza y concentración del electrolito inerte, la actividad microbiana, el contenido en humedad del suelo, etc. Las formas de las curvas de



equilibrio<sup>238</sup> de adsorción son muy variadas; pusieron de manifiesto que las isothermas contienen información sobre el mecanismo de adsorción y, en función de la forma de dichas curvas, establecieron una clasificación de cuatro tipos de isothermas (**Figura 1.37**):



**Figura 1.37** - Clasificación de las curvas de equilibrio<sup>238</sup> de las isothermas de adsorción

⇒ Tipo L: denominada también de tipo Langmuir, es la más común de las cuatro. Típica de una adsorción fuerte no competitiva, adsorción que decrece al disminuir el número de lugares de adsorción disponibles en la superficie del adsorbente.

⇒ Tipo H: también denominada de alta afinidad, se puede considerar un caso especial de la isoterma de tipo L; este tipo de isoterma indica que

<sup>238</sup> Giles C.H., Macevan T.H., Nakhwa S.N., Smith D., *Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanism and measurements of specific surface area of solids*. J. Chem. Soc. 111; 3973- 3993, 1960

el adsorbato tiene alta afinidad por el adsorbente, que en disolución es casi completamente adsorbido. Por lo tanto, la parte inicial de la isoterma es vertical.

⇒ Tipo C: tiene una forma lineal, lo que indica una repartición constante del adsorbato entre la disolución y el adsorbente. En este caso la linealidad evidencia que, al mismo tiempo que el soluto es adsorbido, se crean nuevos lugares de adsorción.

⇒ Tipo S: típica de una adsorción competitiva, donde la cantidad adsorbida aumenta a aumentar la concentración del adsorbato en la fase líquida, lo que es debido principalmente a fuerzas de enlace intermolecular.

La adsorción ha sido descrita por varios modelos, que involucran ecuaciones de adsorción de la forma:

$$q = f(C) \quad (1.9)$$

donde  $q$  es la concentración adsorbida ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y  $C$  la concentración de equilibrio ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Las ecuaciones más utilizadas son las correspondientes a las denominadas isoterma lineal e isothermas de Langmuir y de Freundlich.

#### 8.1.4.1 - Isoterma de Langmuir

Langmuir<sup>239</sup> desarrolló en 1918 la isoterma que lleva su nombre, para

---

<sup>239</sup> Langmuir I., *The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum*. J. Am. Chem. Soc. 40; 1361-1403, 1918

describir, en principio, la adsorción de los gases sobre superficies sólidas planas. Posteriormente, dicha isoterma se ha utilizado para la descripción de la adsorción de solutos en el suelo. Harter & Baker<sup>240</sup> discutieron con detalle la historia del desarrollo de la ecuación.

La isoterma de Langmuir presupone las siguientes aproximaciones:

- Las moléculas de adsorbato se retienen en centros de adsorción definidos y localizados.
- Cada centro de adsorción puede retener una sola molécula de adsorbato.
- La energía de adsorción es constante a lo largo de todo el proceso, lo que implica que cada molécula de adsorbato se comporta como si estuviese aislada.

Todo lo anterior conduce a la idea de la existencia de un límite superior de adsorción.

La expresión matemática de esta isoterma<sup>241</sup> es:

$$q = K_1 m_1 C / (1 + K_1 C) \quad (1.10)$$

donde  $q$  es la masa adsorbida de soluto por masa de suelo (expresada en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de suelo),  $C$  es la concentración en equilibrio en la disolución

---

<sup>240</sup> Harter R.D., Baker D.E., *Applications and misapplications of the Langmuir equation to soil adsorption phenomena*. *Soil Sci. Soc. Am. J* 4; 1077-1080, 1977

<sup>241</sup> Fetter C.W., *Contaminant hydrogeology*. Ed. Prentice Hall. Inc., New York, USA, p. 458, 1993

( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $K_l$  es la constante de adsorción ( $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) y  $m_l$  es una constante empírica de saturación ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de suelo).

Una de las formas linealizadas de la anterior ecuación es:

$$1/q = 1/K_l m_l C + 1/m_l \quad (1.11)$$

Esta ecuación se ha utilizado en numerosos estudios sobre adsorción de diversos solutos como aniones: Cole<sup>242</sup> *et al.* (1953), Fried & Shapiro<sup>243</sup> (1956), Olsen & Watanabe<sup>244</sup> (1957), Weir & Soper<sup>245</sup> (1962), Kuo & Lotse<sup>246</sup> (1972), Syers<sup>247</sup> *et al.* (1973), Peña & Torrent<sup>248</sup> (1984), Barrow<sup>249</sup> (1978), López<sup>250</sup> *et al.* (1990), Singh & Gilkes<sup>251</sup> (1991), Porter & Sánchez<sup>252</sup> (1992), Sanyal<sup>253</sup> *et al.* (1993), Sakadevan & Bavor<sup>254</sup> (1998),

<sup>242</sup> Cole C.V., Olsen S.R., Scott C.O., *The nature of phosphate sorption by calcium carbonate*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 17; 305-316, 1953

<sup>243</sup> Fried M., Shapiro R. E., *Phosphate supply pattern of various soils*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 20; 471-475, 1956

<sup>244</sup> Olsen S.R., Watanabe F.S., *A method to determine a phosphorus adsorption maximum of soils as measured by the Langmuir isotherm*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 21; 144-149, 1957

<sup>245</sup> Weir C.C., Soper R.J., *Adsorption and exchange studies of phosphorus in some Manitoba soils*. Can. J. Soil Sci. 42; 31-42, 1962

<sup>246</sup> Kuo S., Lotse E.G., *Kinetics of phosphate adsorption by calcium carbonate and Ca-Kaolinite*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36; 725-729, 1972

<sup>247</sup> Syers J.K., Browman G.M., Smillie G.W., Corey R.B., *Phosphate sorption by soils evaluated by the Langmuir adsorption equation*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37; 358-363, 1973

<sup>248</sup> Peña F., Torrent J., *Relationships between phosphate sorption and iron oxides in Alfisols from a river terrace sequence of Mediterranean Spain*. Geoderma 33; 283-296, 1984

<sup>249</sup> Barrow N. J., *The description of phosphate adsorption curves*. J. Soil Sci. 29; 447-462, 1978

<sup>250</sup> López S.C., Bárbaro N.O., De Tramontini S.R., *Effect of previous fertilization on phosphorus adsorption. Measurement of surface phosphorus by isotopic exchange*. Soil Sci. 150; 594-601, 1990

<sup>251</sup> Singh B., Gilkes R. J., *Phosphorus sorption in relation to soil properties for the major soil properties types of South Western Australia*. Aust. J. Soil Res. 29; 603-618, 1991

<sup>252</sup> Porter S.P., Sánchez C.A., *The effects of soil properties on phosphorus sorption by Everglades Histosols*. Soil Sci. 154; 387-398, 1992

<sup>253</sup> Sanyal S.K., De Datta S.K., Chan P.Y., *Phosphate sorption - desorption behavior of some acidic soils of south and southeast Asia*. Soil Sci. Soc. Am. J. 57; 937-945, 1993

<sup>254</sup> Sakadevan K., Bavor H.J., *Phosphate adsorption characteristics of soils, slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems*. Water Res. 32; 2, 393-399, 1998

Cheung & Venkitachalam<sup>255</sup> (2000), Abekoe & Sahrawat<sup>256</sup> (2001), Hooda<sup>257</sup> *et al.* (2001), Pant<sup>258</sup> *et al.* (2001), y de tensioactivos iónicos: Malik<sup>259</sup> *et al.* (1972), Tadros<sup>260</sup> (1974), Clementz<sup>261</sup> & Robbins (1976), Trogus<sup>262</sup> *et al.* (1977), Dobias<sup>263</sup> (1977), Dobias<sup>264</sup> (1978), Purakayastha<sup>265</sup> *et al.* (2002).

#### 8.1.4.2 - Isoterma de Freundlich

Freundlich, en 1926, propuso una isoterma que corresponde a un modelo en el que se supone que los centros de adsorción no son homogéneos.

La ecuación matemática de este modelo es<sup>241</sup>:

$$q = K_f C^n \quad (1.12)$$

<sup>255</sup> Cheung K.C., Venkitachalam T.H., *Improving phosphate removal of sand infiltration system using alkaline flyash*. Chemosphere 41; 243-249, 2000

<sup>256</sup> Abekoe M.K., Sahrawat K.L., *Phosphate retention and extractability in soils of the humid zone in West Africa*. Geoderma 102; 175-187, 2001

<sup>257</sup> Hooda P.S., Truesdale V.W., Edwards A.C., Withers P.J.A., Aitken M.N., Miller A., Rendell A.R. *Manuring and fertilization effects on phosphorus accumulation in soils and potential environmental implications*. Adv. Environ. Res. 5; 13-21, 2001

<sup>258</sup> Pant H.K., Reddy K.R., Lemon E., *Phosphorus retention capacity of root bed media of sub-surface flow constructed wetlands*. Ecol. Eng., 17; 345-355, 2001

<sup>259</sup> Malik W.U., Srivastava S.K., Gupta D., *Studies on the interaction of cationic surfactants with clay minerals*. Clay Miner. 9; 369-382, 1972

<sup>260</sup> Tadros Th.F., *The interaction of cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecylbenzene sulfonate with polyvinyl alcohol. adsorption of the polymer-surfactant complexes on silica*. J. Colloid Interface Sci. 46; 528-540, 1974

<sup>261</sup> Clementz D.M., Robbins J.L., *Adsorption of dodecylbenzene sulfonate on NA(+)-montmorillonite: effect of salt impurities*. Soil Sci. Soc. Amer. J. 40; 663- 665, 1976

<sup>262</sup> Trogus F.J., Schetcher R.S., Pope G.A., Wade W.H., *Adsorption of mixed surfactant systems*. Soc. Pet. Eng. J. 17; 337-351, 1977

<sup>263</sup> Dobias B., *Adsorption and electrokinetic phenomena in the system solid - micellar solution of a surface-active substance*. Colloid Polym. Sci. 255; 682-690, 1977

<sup>264</sup> Dobias B., *Adsorption kinetics of surface-active substances from micellar solutions on solid phase*. Colloid Polym. Sci. 256; 465-470, 1978

<sup>265</sup> Purakayastha P.D., Pal A., Bandyopadhyay M., *Adsorption of anionic surfactant by a low-cost adsorbent*. J. Environ Sci. Health 35; 925-938, 2002

donde  $K_f$  es la constante de adsorción y  $n$  es una constante empírica (proveniente del término  $1/n$ ), con valor comprendido entre 0 y 1.

La forma linealizada de la ecuación anterior es:

$$\ln(q) = \ln(K_f) + n \ln(C) \quad (1.13)$$

En el modelo de Freundlich la energía de adsorción disminuye exponencialmente cuando aumenta la cantidad de soluto adsorbido en la superficie de los minerales del suelo.

Como referencias bibliográficas, se puede encontrar numerosos trabajos que utilizan la isoterma de Freundlich para describir la adsorción de determinados solutos. Varios de estos trabajos la aplican para la adsorción de aniones como los fosfatos (Barrow<sup>249</sup>, 1978; Singh & Gilkes<sup>251</sup>, 1991; Porter & Sánchez<sup>252</sup>, 1992; Sanyal<sup>253</sup> *et al.*, 1993; Cheung & Venkitachalam<sup>255</sup>, 2000). Otros autores la han utilizado para estudiar distintas sustancias: los sulfatos (Bonemisza & Llanos<sup>266</sup>, 1967), el cadmio (Street<sup>267</sup> *et al.*, 1977), el cobre y el zinc (Sidle<sup>268</sup> *et al.*, 1977), varios pesticidas (Sánchez-Martín<sup>269</sup> *et al.*, 1995; González & Ukrainczyk<sup>270</sup>, 1996 y Kibe<sup>271</sup> *et al.*, 2000) y tensioactivos iónicos

<sup>266</sup> Bonemisza E., Llanos R., *Sulfate movement adsorption and desorption in three Costa Rican soils*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 31; 356-360, 1967

<sup>267</sup> Street J.J., Lindsay W.L., Sabey B.R., *Solubility and plant uptake of cadmium in soils amended with cadmium and sewage sludge*. *J. Environ. Qual.* 6; 72-77, 1977

<sup>268</sup> Sidle R.C., Kardos L.T., Van Genuchten M.Th., *Heavy metals transport model in a sludge-treated soil*. *J. Environ. Qual.* 6; 438-443, 1977

<sup>269</sup> Sánchez-Martín M.J., Lorenzo L.R., Crisanto T., Arienzo M., Camazano M.S., *Influence of soil properties on the adsorption and mobility of metamitron*. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 26; 19-20, 3243-3259, 1995

<sup>270</sup> González J.M., Ukrainczyk L., *Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils*. *J. Environ. Qual.* 25; 1186-1192, 1996

<sup>271</sup> Kibe K., Takahashi M., Kameya T., Uranó K., *Adsorption equilibrium of principal herbicides on paddy soil in Japan*. *Sci. Tot. Environ.* 263; 115-125, 2000

(Cano<sup>272</sup> & Dorn, 1996; Mahvi<sup>273</sup> *et al.*, 2004; Sibel<sup>274</sup>, 2004; Rodríguez-Cruz<sup>275</sup> *et al.*, 2005).

#### 8.1.4.3 - Isoterma lineal

La isoterma lineal, como su nombre indica, presenta una relación lineal y directa entre la cantidad de soluto adsorbida y su concentración en equilibrio. Se describe con la ecuación:

$$q = K C \quad (1.14)$$

donde  $K$  es la constante de adsorción ( $L \cdot kg^{-1}$ ).

#### 8.1.4.4 - Otras isotermas

Numerosos autores han propuesto diferentes modelos para la descripción matemática de las isotermas de adsorción. Entre tales aportaciones, merecen ser mencionadas la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller (BET), que describe el fenómeno de adsorción multicapa, la ecuación de Van der Waals<sup>235</sup>, la isoterma de Langmuir para superficies con diferentes lugares de adsorción, que pone de manifiesto la existencia de dos o más tipos de lugares de adsorción, y la expresión de Tempkin, que describe un modelo en el cual la energía de adsorción disminuye linealmente cuando

---

<sup>272</sup> Cano M.L., Dorn P.B., *Sorption of an alcohol ethoxylate surfactant to natural sediments*. Environ. Toxicol. Chem. 15; 684-690, 1996

<sup>273</sup> Mahvi A.H., Vaezi F., Alavi N., *Evaluating GAC for detergent removal from the secondary effluent of ghods wastewater treatment plant*. Pakistan J. Biol. Sci. 7; 2121-2124, 2004

<sup>274</sup> Sibel Z., *Investigation of the adsorption of anionic surfactants at different pH values by mean of active carbon and the kinetics of adsorption*. J. Serb. Chem. Soc. 69; 25-32, 2004

<sup>275</sup> Rodríguez-Cruz M.S., Sanchez-Martin M.J., Sanchez-Camazano M., *A comparative study of adsorption of an anionic and a non-ionic surfactant by soils based on physicochemical and mineralogical properties of soils*. Chemosphere 61; 56-64, 2005

la cantidad del soluto adsorbido aumenta. En la siguiente tabla se representa un ejemplo de algunas de las ecuaciones más empleadas para describir las isotermas de adsorción:

**Tabla 1.15** - Expresiones matemáticas de algunas isotermas<sup>249</sup> utilizadas en el estudio de adsorción

Tempkin	$\ln(C) = K_1 + K_2 q$
Isoterma de Langmuir para superficies con diferentes lugares de adsorción	$q = (K_1 m_1 C / (1 + K_1 C)) + (K_2 m_2 C / (1 + K_2 C)) + \dots + (K_n m_n C / (1 + K_n C))$

## 8.2 - Transporte de solutos

El transporte de solutos está regido por varios mecanismos de modo que es necesaria la creación y realización de modelos matemáticos ya que, con estas herramientas, se permite analizar y modelar el transporte de los contaminantes que interaccionan entre sí o con el medio.

### 8.2.1 - Ecuación de transporte de solutos en medio poroso

Para describir adecuadamente el movimiento de compuestos no volátiles (conservativos) en el suelo es necesario conocer la evolución temporal de la concentración en el soluto reactivo de que se trate en cada punto del dominio estudiado. La distribución espacial de dicha concentración depende: **a)** del movimiento del agua en la dirección del flujo (convección); **b)** de la propagación longitudinal y transversal del soluto (dispersión); que a su vez produce una expansión del volumen ocupado



por el soluto en cuestión, con la consiguiente disminución de las concentraciones y **c)** de diversos procesos químicos que pueden implicar generación o consumo del compuesto estudiado (formación de complejos, reacciones ácido-base, hidrólisis, disolución-precipitación, oxidación-reducción, intercambio iónico, etc.).

- \* *La convección.* El transporte convectivo o flujo másico es debido al movimiento pasivo del soluto disuelto en el agua.
- \* *La dispersión.* Por su parte, es debida a mecanismos de dispersión mecánica y difusión molecular.

La dispersión mecánica incluye los procesos de mezcla provocados por las variaciones locales del módulo y de la dirección del vector velocidad, con respecto a su valor medio, debido a los diferentes tipos, tamaños y orientación de los poros.

La difusión molecular es un proceso debido a la existencia de un gradiente de concentraciones del soluto, en el que éste se desplaza de zonas de alta concentración a zonas de baja concentración.

El resultado de la influencia de todos los factores mencionados se plasma en la ecuación de transporte unidimensional en medio poroso, que es una consecuencia de la condición de continuidad de masa en un volumen elemental: el balance neto de los flujos másicos de entrada y salida debe ser igual al cambio de masa por unidad de tiempo.

La ecuación resultante es:

$$\partial C_t / \partial t = - (\partial J / \partial z) - G \quad (1.15)$$

Donde  $C_t$  es la masa de soluto por unidad de volumen de suelo ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $J$  es el flujo de masa total del soluto por unidad de superficie y por unidad de tiempo y  $G$  es el consumo (transformación o degradación) de soluto, expresado en masa por unidad de volumen y unidad de tiempo.

$$J = J_c + J_m + J_d \quad (1.16)$$

Donde  $J_c$  es el flujo convectivo,  $J_m$  el flujo másico debido a la dispersión mecánica y  $J_d$  el flujo debido a la difusión.

$$J_c = \theta u C \quad (1.17)$$

Donde  $\theta$  es la porosidad del suelo,  $u$  la velocidad intersticial de flujo y  $C$  la concentración de soluto en el fluido.

$$J_m = - \theta D_m \partial C / \partial z \quad (1.18)$$

En donde  $D_m$  es el coeficiente de dispersión mecánica

$$J_d = - \theta D_h \partial C / \partial z \quad (1.19)$$

$D_h$  representa el coeficiente de difusión en el medio poroso.

$$D = D_h + D_m \quad (1.20)$$

Donde  $D$  es el coeficiente de dispersión hidrodinámica, que se obtiene sumando  $D_h$  y  $D_m$ , valores todos expresados en unidad de superficie por unidad de tiempo.

Sustituyendo las ecuaciones (1.17), (1.18), (1.19) y (1.20) en la ecuación (1.16), se obtiene la ecuación:

$$\mathbf{J} = -\theta \mathbf{D} \frac{\partial C}{\partial z} + \theta \mathbf{u} C \quad \frac{\partial \mathbf{J}}{\partial z} = -\theta \mathbf{D} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \theta \mathbf{u} \frac{\partial C}{\partial z} \quad (1.21)$$

Para un soluto que sufre adsorción:

$$C_t = \theta C + \rho q \quad \frac{\partial C_t}{\partial t} = \theta \frac{\partial C}{\partial t} + \rho \frac{\partial q}{\partial t} \quad (1.22)$$

Donde  $q$  es la masa de soluto por unidad de masa de sólido y  $\rho$  la densidad aparente del suelo.

Combinando las ecuaciones (1.21), (1.15) y (1.22), resulta:

$$C/\partial t + \rho / \theta \partial q/\partial t = \mathbf{D} \partial^2 C/\partial z^2 - \mathbf{u} \partial C/\partial z \quad (1.23)$$

La ecuación (1.23) contempla, por este orden, la variación temporal de la concentración en disolución y de la masa de soluto adsorbida, el flujo por dispersión hidrodinámica, el flujo por convección y la velocidad de aparición o de desaparición del compuesto analizado (degradación, precipitación, etc.).

En todos aquellos casos en que no haya aparición o desaparición del soluto (lo que refleja de forma aproximada la mayoría de las situaciones experimentales para los iones estudiados), su término se suprime y la ecuación (1.23) se reduce a:

$$\partial C/\partial t + \rho/\theta \partial q/\partial t = \mathbf{D} \partial^2 C/\partial z^2 \quad (1.24)$$

Para utilizar la ecuación (1.24), se debe definir la evolución en el tiempo de la masa adsorbida en el sólido ( $\partial q/\partial t$ ). Para ello se han desarrollado modelos que consideran condiciones de equilibrio o de no equilibrio, donde predominan los procesos cinéticos.

La resolución matemática de la ecuación (1.24) depende asimismo de la linealidad de la isoterma; en caso de isoterma no lineal, se requieren métodos numéricos para su resolución.

### 8.2.2 - Modelo de equilibrio local

El modelo de equilibrio local es el modelo más simple. Este modelo asume que los fenómenos de transferencia que pueden ocurrir son lo suficientemente rápidos como para admitir que, en cada punto y en cada instante, se establece el equilibrio entre las fases líquida y sólida, considerando, por lo tanto, que la adsorción es instantánea. Así que, bajo esa condición, se puede admitir que  $q = f(C)$ .

#### 8.2.2.1 - Isoterma lineal

Para el caso más sencillo de equilibrio local, donde la isoterma es lineal:

$$q = K C \quad \partial q/\partial t = K \partial C/\partial t \quad (1.25)$$

Lo que implica que la ecuación de transporte (1.24) se transforma en:

$$[1 + (\rho K/\theta)] \partial C/\partial t = D \partial^2 C/\partial z^2 - u \partial C/\partial z \quad (1.26)$$

Aplicada a una experiencia en columna, esta ecuación se puede expresar en términos relativos, definiendo para ello los siguientes módulos

adimensionales que representan los valores relativos de diversas variables en relación con el valor de otras usadas como valor de referencia:

$$\mathbf{R} = 1 + (\rho \mathbf{K}/\theta) \quad (1.27)$$

$$\mathbf{T} = (\mathbf{u} \mathbf{t}) / \mathbf{L} \quad (1.28)$$

$$\mathbf{x} = \mathbf{z} / \mathbf{L} \quad (1.29)$$

$$\mathbf{c} = \mathbf{C} / \mathbf{C}_0 \quad (1.30)$$

$$\mathbf{P}_e = \mathbf{uL} / \mathbf{D} \quad (1.31)$$

Donde  $R$  es el factor de retraso o de retención y está relacionado con la capacidad de adsorción del soluto y  $T$  expresa la distancia (referida a la longitud  $L$  de la columna) recorrida por el soluto transcurrido un tiempo  $t$ ; este módulo  $T$  es equivalente al volumen de agua que circula a través de los poros;  $x$  es una distancia (profundidad) relativa, referida a la longitud de la columna ( $L$ ),  $c$  es el módulo de concentración relativa respecto a la concentración inicial  $C_0$  y  $P_e$  es el módulo adimensional de Peclet, que representa una medida de la incidencia de la convección frente al flujo dispersivo; valores altos de este módulo reflejan poca influencia de la dispersión frente a la convección (flujo pistón), y valores bajos indican flujo disperso. Así, la ecuación (1.26) puede escribirse:

$$\mathbf{R} \partial \mathbf{c} / \partial \mathbf{T} = 1 / \mathbf{P}_e \partial^2 \mathbf{c} / \partial \mathbf{x}^2 \quad (1.32)$$

### 8.2.2.2 - Isoterma no lineal

En el caso de isoterma de Freundlich:

$$q = K_f C^n \quad (1.33)$$

$$\partial q / \partial t = 1/n K_f C^{n-1} \partial C / \partial t \quad (1.34)$$

$$[1 + (\rho K_f 1/n) (C^{n-1} / \theta)] \partial C / \partial t = D \partial^2 C / \partial z^2 - u \partial C / \partial z \quad (1.35)$$

En caso de isoterma de tipo Langmuir:

$$q = K_l m_l C / (1 + K_l C) \quad (1.36)$$

$$\partial q / \partial t = [K_l m_l (1 + K_l C)^2] \partial C / \partial t \quad (1.37)$$

$$[1 + (\rho K_l m_l / \theta (1 + K_l C)^2)] \partial C / \partial t = D \partial^2 C / \partial z^2 - u \partial C / \partial z \quad (1.38)$$

El modelo de equilibrio local representado por las ecuaciones (1.26), (1.35) y (1.38) es el modelo más simple para simular las curvas de rotura y requiere un número mínimo de parámetros para poder efectuar la modelización<sup>276</sup> del sistema. Estos parámetros pueden ser:

- La densidad aparente del suelo  $\rho$ .
- Los parámetros de la isoterma de adsorción:  $n$  y  $K_f$ , en el caso de Freundlich,  $m_l$ ,  $K_l$  en el caso de Langmuir y  $K_{li}$  en el caso de la isoterma lineal.
- El caudal del influente ( $Q$ ) y la concentración inicial inyectada ( $C_o$ ).

<sup>276</sup> Hatzikioseyan A., Tsezos M., Mavituna F., Application of simplified rapid breakthrough curves from fixed bed biosorption reactors. Hydrometallurgy 59; 395-406, 2001

- La porosidad del lecho ( $\theta$ ).
- Las características geométricas de la columna, es decir, el área de la sección transversal de la columna ( $A$ ) y la longitud de la columna ( $L$ ), que determinan la velocidad intersticial del flujo ( $u = Q/A \theta$ ).
- El coeficiente de dispersión hidrodinámica ( $D$ ).

A pesar de la ventaja que supone la sencillez del modelo de equilibrio local, en muchos casos no resulta el más adecuado, puesto que considera la singularidad de los procesos de adsorción - desorción, condición que no siempre se cumple debido a que la presencia de histéresis implica la necesidad de emplear diferentes coeficientes para reproducir el equilibrio. Hay que añadir que el mismo modelo supone un equilibrio instantáneo durante el transporte, que asimismo puede no cumplirse. Valocchi<sup>277</sup> (1985) presentó un conjunto de criterios cuantitativos para evaluar la validez de este modelo, en el caso de flujo estacionario unidimensional, a través de suelos no homogéneos, con inyección intermitente del soluto.

### 8.2.3 - Modelos de no equilibrio

Para reflejar los procesos de no equilibrio durante el transporte de soluto a través del medio poroso, hay que considerar los procesos cinéticos en la adsorción. Entre los diversos modelos de no equilibrio que han sido propuestos, se comentan a continuación los dos planteamientos más extendidos en la modelización de las curvas de rotura: los modelos de dos sitios (Cameron &

---

<sup>277</sup> Valocchi A.J., *Validity of the local equilibrium assumption for modeling sorbing solute transport through homogeneous soils*. Water Resour. Res. 21; 808-820, 1985

Klute<sup>278</sup>, 1977) y de dos regiones (Van Genuchten & Wierenga<sup>279</sup>, 1976).

### 8.2.3.1 - Modelo de dos sitios

El modelo de dos sitios asume que la adsorción obedece a la combinación de procesos de equilibrio y cinéticos. La fase sólida del medio poroso no es homogénea, puesto que se compone de diferentes constituyentes en distintas fracciones (orgánicos, minerales, etc.), que proporcionan distintos tipos de interacciones con el soluto. Y así el modelo supone que los centros de adsorción pueden ser divididos en dos fracciones: una fracción de puntos de adsorción en el suelo, en los que se alcanza el equilibrio instantáneamente (1), y otra fracción (2), en cuyos puntos es la cinética quien controla el proceso.

En equilibrio lineal, las masas totales adsorbidas en los sitios de tipo (1) y (2) se pueden expresar:

$$q_1 = K_1 C = F K C \quad (1.39)$$

$$q_2 = K_2 C = (1-F) K C \quad (1.40)$$

Así, en equilibrio, la masa total adsorbida ( $q$ ) se obtiene sumando la correspondiente a las fracciones ( $q_1$ ) y ( $q_2$ ).

$$q = q_1 + q_2 \quad (1.41)$$

Donde  $F$  es la fracción del total de sitios del tipo (1),  $K$  es la constante de

<sup>278</sup> Cameron D.R., Klute A., *Convective-dispersive solute transport with a combined equilibrium and kinetic adsorption model*. Water Resour. Res. 13; 183-188, 1977

<sup>279</sup> Van Genuchten M.Th., Wierenga P.J., *Mass transfer studies in porous media: 1. Analytical solutions*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 40; 473-480, 1976



adsorción y  $K_1$  y  $K_2$  son las constantes de adsorción correspondientes a los sitios de tipo (1) y (2), respectivamente.

La concentración del soluto en la solución y la fase adsorbida están en equilibrio en los sitios de tipo (1), por lo que se cumple la relación:

$$\partial q_1 / \partial t = F K \partial C / \partial t \quad (1.42)$$

En los sitios de tipo (2), la adsorción está controlada por reacciones cinéticas reversibles de primer orden, que incluyen los procesos de transporte en el interior de los poros y la adsorción propiamente dicha.

$$\partial q_2 / \partial t = \alpha_2 [(1-F) K C - q_2] \quad (1.43)$$

Donde  $\alpha_2$  es el coeficiente cinético de primer orden, de dimensiones  $t^{-1}$ , expresadas usualmente en segundo como unidad de tiempo ( $s^{-1}$ ).

Sustituyendo las ecuaciones (1.41), (1.42) y (1.43), la ecuación (1.24) puede escribirse:

$$[1 + (F \rho K / \theta)] \partial C / \partial t + \rho / \theta \partial q_2 / \partial t = D \partial^2 C / \partial z^2 - u \partial C / \partial z \quad (1.44)$$

Para expresar las ecuaciones del modelo de dos sitios en términos relativos, se utilizan, por una parte, los módulos ya definidos en las ecuaciones (1.27), (1.28), (1.29) y (1.31), cuyo carácter adimensional responde a que constituyen la expresión del valor relativo de determinadas variables (distancia, concentración, etc.) respecto a otras de las mismas dimensiones, utilizadas como referencia (longitud de la columna, concentración inicial, etc.). Además, se utilizan los siguientes módulos, igualmente adimensionales:

$$\beta = (\theta + F \rho K) / (\theta + \rho K) \quad (1.45)$$

$$c_1 = C/C_0 \quad (1.46)$$

$$c_2 = q_2 / (1 - F) K C_0 \quad (1.47)$$

$$w = [\alpha_2 (1 - \beta) R L] / u \quad (1.48)$$

El módulo  $\beta$ , denominado coeficiente de partición, está relacionado con la fracción de puntos que están sometidos a control cinético. Si el valor de  $\beta$  tiende 1, prácticamente todos los sitios de fijación del sólido alcanzarán el equilibrio de adsorción instantáneamente. Si, por el contrario, el valor de  $\beta$  tiende a cero, se describe la situación inversa de control cinético en prácticamente la totalidad de suelo.

El módulo  $w$ , otras veces identificado con el símbolo  $Sh$ , en atención a que se denomina módulo de Sherwood, da cuenta de la velocidad con la que se alcanza el equilibrio cuando éste no es instantáneo. Si  $w$  tiende a infinito, el fenómeno de no equilibrio se minimiza y el equilibrio se establece localmente, lo que indica que el control cinético de los sitios de tipo (2) no es significativo, independientemente de la fracción de sitios, debido a que existe una cinética de adsorción muy rápida.

$c_1$  representa el módulo de concentración relativa respecto a la concentración inicial  $C_0$  en la fase líquida.

$c_2$  representa el módulo de concentración relativa adsorbida en los centros activos de tipo (2) respecto a la concentración inicial  $C_0$ .

Con todo ello, la ecuación (1.24) puede expresarse en términos relativos,

es decir, en forma adimensional, como sigue:

$$\beta R \partial c_1 / \partial T + (1-\beta) R \partial c_2 / \partial T = 1/P_e \partial^2 c_1 / \partial x^2 - \partial c_1 / \partial x \quad (1.49)$$

$$(1-\beta) R \partial c_2 / \partial T = w (c_1 - c_2) \quad (1.50)$$

### 8.2.3.2 - Modelo de dos zonas (bizonal)

Denominado también de dos regiones, este modelo es una extensión de los modelos citados por Deans<sup>280</sup> (1963) y Coats & Smith<sup>281</sup> (1964) y supone que el medio fluido en la columna se divide en dos zonas: una zona denominada móvil, a través de la cual circula el fluido, y otra denominada inmóvil, donde el fluido permanece estancado. Esta partición define a su vez la división de la fase sólida, en la que se distingue una zona donde los centros de adsorción del sólido ( $F$ ) están en contacto con la fase líquida móvil y el transporte tiene lugar por convección-dispersión, mientras que en la segunda zona, fracción ( $I-F$ ), lo está con la fase líquida inmóvil y el transporte del soluto desde la fase móvil es únicamente difusional. En este modelo se establece la existencia de transferencia de materia entre estas dos zonas (Van Genuchten & Wierenga<sup>279</sup>, 1976).

Considerando que existe equilibrio entre la fase sólida y la líquida, tanto en la zona móvil (identificada con el subíndice " $m$ ") como en la zona inmóvil (subíndice " $im$ "), y considerando también que la adsorción es lineal ( $q = K C$ ) e instantánea en ambas zonas, se puede escribir:

$$q = q_m + q_{im} \quad (1.51)$$

<sup>280</sup> Deans H.H., *A mathematical model for dispersion in the direction of flow in porous media*. Soc. Petroleum Eng. J. 3; 49-52, 1963

<sup>281</sup> Coats K.H., Smith B.D., *Dead-end pore volume and dispersion in porous media*. Soc. Petroleum Eng. J. 4; 73-84, 1964

$$\mathbf{q}_m = F K C_m \quad (1.52)$$

$$\mathbf{q}_{im} = (1-F) K C_{im} \quad (1.53)$$

Por otro lado, la división de la fase líquida en dos zonas hace que el sorbato se distribuya entre ellas:

$$\theta C = \theta_m C_m + \theta_{im} C_{im} \quad (1.54)$$

Con todo lo anterior, la ecuación (1.23) se transforma en:

$$\begin{aligned} \theta_m \partial C_m / \partial t + \theta_{im} \partial C_{im} / \partial t + \rho F K \partial C_m / \partial t + (1-F) \rho K \partial C_{im} / \partial t = \\ D \theta_m \partial^2 C_m / \partial z^2 - u \theta_m \partial C_m / \partial z \end{aligned} \quad (1.55)$$

$$\begin{aligned} (\theta_m + \rho F K) \partial C_m / \partial t + [\theta_{im} + (1-F) \rho K] \partial C_{im} / \partial t = \\ D \theta_m \partial^2 C_m / \partial z^2 - u \theta_m \partial C_m / \partial z \end{aligned} \quad (1.56)$$

La transferencia del soluto entre las dos zonas es proporcional a la diferencia de concentraciones entre ambas y se define por la ecuación:

$$[\theta_{im} + (1-F) \rho K] \partial C_{im} / \partial t = \alpha (C_m - C_{im}) \quad (1.57)$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia de materia entre la región móvil e inmóvil, expresado en  $s^{-1}$ .

Para escribir en términos relativos la ecuación general de transporte de solutos, es necesario utilizar, en primer lugar, los módulos adimensionales

$R$  y  $P_e$ , ya definidos en las ecuaciones (1.27) y (1.31).

$$T = (u \theta_m t) / \theta L \quad (1.58)$$

$$c_m = C_m / C_0 \quad (1.59)$$

$$c_{im} = C_{im} / C_0 \quad (1.60)$$

$$w = Sh = \alpha L / \theta_m u \quad (1.61)$$

$$\beta = (\theta_m + F \rho K) / (\theta + \rho K) \quad (1.62)$$

Por su parte,  $c_m$  y  $c_{im}$  representan las concentraciones relativas, respecto a la concentración inicial  $C_0$ , en la fase móvil y en la fase inmóvil, respectivamente.

Finalmente, los módulos  $T$ ,  $\beta$  y  $Sh$  equivalen a los ya definidos en el modelo de dos sitios con las ecuaciones (1.28), (1.45) y (1.48), respectivamente, aunque en este caso modificados con los valores de la porosidad de la zona móvil  $\theta_m$  y de la porosidad total  $\theta$ .

En el caso del modelo de dos zonas, si el módulo de Sherwood ( $w$ ) tiende a infinito, eso significa que la velocidad de transferencia de materia entre las dos zonas del suelo móvil e inmóvil es muy elevada.

El coeficiente de partición ( $\beta$ ), por su parte, está relacionado con la fracción de agua móvil e inmóvil, en el caso del modelo de dos regiones. Si su valor tiende a 1, prácticamente toda el agua será móvil. Si, por el contrario, su valor tiende a cero, se describe la situación inversa.

Con todo ello se obtienen las expresiones de la ecuación de transporte en términos relativos (adimensionales):

$$\beta R \partial c_m / \partial T + (1-\beta) R \partial c_{im} / \partial T = 1/P_e \partial^2 c_m / \partial x^2 - \partial c_m / \partial x \quad (1.63)$$

$$(1-\beta) R \partial c_{im} / \partial T = w (c_m - C_{im}) \quad (1.64)$$

Nkedi-Kizza<sup>282</sup> *et al.* (1984) muestran que las expresiones matemáticas adimensionales de los modelos de dos regiones y de dos sitios son equivalentes, por lo que son válidos los mismos métodos de resolución, a pesar de ser diferente la interpretación de algunos parámetros, como se ha comentado anteriormente (Van Genuchten & Wierenga<sup>279</sup>, 1976).

En la siguiente tabla se resumen algunos estudios de adsorción del LAS en distintas matrices ambientales:

**Tabla 1.16 - Isotermas de adsorción del LAS en diversas matrices ambientales**

Ref.	Matriz	Isoterma
283	Suelo: arenoso regosol; suelo: arcilloso grumusol	Lineal
284	Lodo activado	Lineal

<sup>282</sup> Nkedi-Kizza P., Biggar J.W., Selim H.M., Van Genuchten M.Th., Wierenga P.J., Davidson J.M., Nielsen D.R., *On the equivalence of two conceptual models for describing ion exchange during transport through an aggregated Oxisol*". Water Resour. Res., 20; 1123-1130, 1984

<sup>283</sup> Acher A.J., Yaron B., *Behavior of anionic surfactants in a soil-sewage effluent system*. J. Environ. Qual. 6; 418-420, 1977

<sup>284</sup> Urano K., Saito M., *Adsorption of surfactants on microbiologies*. Chemosphere 13; 285-292, 1984

Tabla 1.16 - Continuación

Ref.	Matriz	Isoterma
285	Sedimento de río	Lineal
286	Suelos	Lineal (< 90 ppm)
287	Sedimento de río; Suelos	Langmuir
288	Sedimento de pantano	Langmuir
289	Lodo; suelos; sedimento de río	Freundlich
50	Suelos	Freundlich
221	Lodo activado	Freundlich
290	Suelos	Freundlich

<sup>285</sup> Hand V.C., Williams G.K., *Structure-Activity Relationships for sorption of linear alkylbenzene sulfoantes*. Environ. Sci. Technol. 21; 370-373, 1987

<sup>286</sup> Ou Z.Q., Yediler A., He Y., Jia L.Q., Kettrup A., Sun T.H., *Adsorption of LAS on soil*, Chemosphere 32; 827-839, 1996

<sup>287</sup> Matthijs E., De Henau H., *Adsorption and desorption of LAS*. Tenside Surf. Det. 22; 299-304, 1985

<sup>288</sup> Inaba K., Iwasaki K., Yagi O., *A method for behaviour analysis of synthetic chemicals in the aquatic environment using their adsorption constants - A study of linear alkylbenzenesulfonate in wetland*. Environ. Technol. Lett. 9; 1387-1392, 1988

<sup>289</sup> Painter H.A., Zabel T.F., *Review of the environmental safety of linear alkylbenzene sulfonates (LAS)*. Wrc Medmendahm, UK. Report n° CO 1659-M/1/EV 8658, 1988

<sup>290</sup> Tolls J., Sijm D.T.H.M., *Estimating the properties of surface-active chemicals*. In: *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences* by Boethling, R.S., Mackay D., CRC Press Ed., Boca Ratón, USA, Chapter 17, 2000

Tabla 1.16 - Continuación

Ref.	Matriz	Isoterma
291	Sedimento marino	Freundlich
292	Sedimento de río	Freundlich
293	Suelos	Freundlich
294	Suelo arcilloso	Freundlich
295	Ácido Húmico	Freundlich
296	Suelos	Freundlich

En estos estudios se pueden encontrar autores como Ou<sup>286</sup> *et al.* (1996), Karickhoff<sup>297</sup> *et al.* (1979), Litz<sup>50</sup> *et al.* (1987), Larsen<sup>298</sup> *et al.* (1992),

<sup>291</sup> Fytianos K., Voudrias E., Mouratidou Th., *The sorption-desorption behavior of linear alkylbenzene sulfonate in marine sediments*. Chemosphere 36, 9; 2067-2074, 1998

<sup>292</sup> Urano K., Saito M., Murata C., *Adsorption of surfactants on sediments*. Chemosphere 13; 293-300, 1984

<sup>293</sup> Abe S., Seno M., *Adsorption of Anionic Surfactants on Soils*. Nippon Kagaku Kaishi 5; 814-819, 1985

<sup>294</sup> Abe S., Seno M., *Adsorption Behavior of Anionic Surfactants on Soil Clays*. Nippon Kagaku Kaishi 5; 820-825, 1985

<sup>295</sup> Abe S., Seno M., *Adsorption Properties of Anionic Surfactants on to Humic Acid*. Nippon Kagaku Kaishi 9; 1661-1665, 1985

<sup>296</sup> Kristiansen I.B., de Jonge H., Nornberg P., Mather-Christensen O., Elsgaard L., *Sorption of linear alkylbenzene sulfonate to soil components and effects on microbial iron reduction*. Environ Toxicol Chem. 22; 1221-1228, 2003

<sup>297</sup> Karickhoff S.W., Brown D.S. Scott T.A., *Sorption of hydrophobic pollutants of natural sediments*. Water Res. 13; 241-248, 1979

<sup>298</sup> Larsen T., Christensen T.H., Pfeffer F.M., Enfield C.G., *Landfill leachate effect on sorption of organic micropollutants onto aquifer materials*, J. Contaminant Hydrology 9; 307-324, 1992.



Jensen<sup>32</sup> (1999), que afirman que los procesos de adsorción/desorción determinan, en su inmensa mayoría, el comportamiento de los tensioactivos en el medioambiente en lo referente a su lixiviación, degradación abiótica y biótica, biodisponibilidad, acumulación en vegetales, persistencia en suelo, efectos ecológicos combinados o aislados. De acuerdo con sus propiedades físico-químicas, el comportamiento en suelos, de la mayoría de los contaminantes orgánicos, está frecuentemente regido por la relación de partición entre la fase sólida y la líquida. House & Farr<sup>299</sup> (1989) afirman que el coeficiente de adsorción/distribución de los compuestos orgánicos entre ambas fases, en el caso del suelo, es un parámetro indispensable para describir los modelos matemáticos de su lixiviación, de forma que, el estudio del mecanismo de adsorción/desorción juntamente con los procesos de transporte de estas sustancias en el suelo es de gran importancia.

En cuanto al comportamiento del LAS en suelos, en particular su adsorción (Klein<sup>300</sup> *et al.*, 1963; Murti<sup>301</sup> *et al.*, 1966; Inoue<sup>302</sup> *et al.*, 1978), su lixiviación y su degradación es una cuestión donde no hay un consenso en la comunidad científica, siendo todavía motivo de investigación. De los pocos estudios encontrados, algunos incluso llegan a ser contradictorios, razón por la cual este grupo de investigación ha abordado su estudio sistemático.

---

<sup>299</sup> House W.A., Farr I.S., *Adsorption of sulfonates from detergents mixtures on potassium kaolinite*. Colloid. Surf. 40; 167-180, 1989

<sup>300</sup> Klein S.A., Jenkins D., McGauhey P.H., *The fate of ABS in soils and plants*. J. Water Pollut. Control Fed. 35; 636-654, 1963

<sup>301</sup> Murti G.S., Volk V.V., Jackson M.L., *Soil adsorption of linear alkylate sulfonate*. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 30; 685-688, 1966

<sup>302</sup> Inoue K., Kaneko K., Yoshida M., *Adsorption of dodecylbenzene sulfonates by soil colloids and influence of soil colloids on their degradation*. Soil Sci. Plant Nutr. 24; 91-102, 1978

## **9 - LA VEGA DE GRANADA**

A continuación se comentan las principales características de la región de donde se ha llevado a cabo el estudio de campo.

### **9.1 - Antecedentes históricos**

Hace miles de años, la Vega de Granada, era una densa zona boscosa, donde se practicaba la caza, y con extensas zonas de marjalería inundadas. La mayor transformación física se debió a la aparición de la agricultura y la ganadería.

Durante la ocupación musulmana se diseñó probablemente el actual sistema de regadío por acequias, que riegan casi toda la Vega de Granada y que derivan de los principales cursos de agua superficial. Existen pocos datos de la utilización del agua en civilizaciones anteriores, aunque se conservan restos de las obras hidráulicas de época romana e incluso íbera.

Hasta la segunda mitad del siglo XX, no se produjeron cambios significativos en la explotación del acuífero. Estos cambios supusieron la creación de pozos de gran diámetro a lo largo del cauce del río Genil, aunque la explotación del acuífero seguía siendo mínima. En años posteriores se siguieron construyendo pozos en la Vega Baja, conservándose en la actualidad más de un millar de este tipo de sondeos.

A partir de los años 60, la agricultura de la Vega de Granada sufre un nuevo empuje, que se ve reflejado en la realización de grandes sondeos, y además se profundizan algunos de los ya existentes. Es en el último cuarto

de siglo cuando se construyen los embalses de Quéntar (1973) y Canales (1988), que recogen una parte importante de las aguas de deshielo.

## 9.2 - Características físicas y socioeconómicas de la Vega de Granada

El área de la Vega de Granada corresponde a una vasta llanura de aluvión que se extiende a ambos márgenes del río Genil, entre las poblaciones de Cenes de la Vega, al Este, y de Láchar al Oeste.

Los materiales que la forman son los depósitos aluviales del río Genil y de sus afluentes de cabecera, los ríos Dílar, Monachil, Darro, Cubillas y Velillos. Sus dimensiones son de 22 Km de longitud (en sentido Este-Oeste) por unos 8 Km de anchura, con espesores superiores a 250 metros en el sector central<sup>303</sup> (Castillo, 1986).

El acuífero detrítico de la Vega de Granada cuenta con unos recursos hídricos de  $18000 \text{ hm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$  y unas reservas explotables de  $1000 \text{ hm}^3$ . La explotación neta todavía no alcanza el 50% de los recursos renovables y el excedente escapa del sistema a través de emergencias. La pluviometría y temperatura medias anuales del área son de 450 mm y 15 °C, respectivamente<sup>304</sup> (Castillo, 1995).

En ella, en la actualidad, una treintena de poblaciones, incluida Granada capital, se concentra una población estable de 500.000 habitantes. Alrededor de 40.000 personas dependen exclusivamente del abastecimiento de aguas subterráneas, y existe una intensa explotación

---

<sup>303</sup> Castillo A., *Estudio hidroquímico del acuífero de la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 658, 1986

<sup>304</sup> Castillo A., *El embalse subterráneo de la Vega de Granada, uno de los más importantes de Andalucía*. Tierra y Tecnología 9; 37-42, 1995

agrícola que abarca una superficie de regadío de más de 15000 ha. Los cultivos más extendidos corresponden a cereal, choperas, hortalizas, maíz y tabaco. Esta zona corresponde al 95% de la superficie del acuífero, y en ella el espesor no saturado es inferior a 25 metros en más de la mitad de su extensión.

### 9.3 - Calidad de las aguas subterráneas en la Vega de Granada

Las aguas del acuífero proceden en más de un 70% de la infiltración de escorrentías del deshielo de Sierra Nevada, hecho que condiciona que los sectores de mejor calidad se localicen en la cabecera del acuífero (área Sur-oriental) y bajo la cabecera del río Genil.

Existen focos puntuales de enriquecimientos salinos y de contaminación por nitratos (Castillo<sup>304</sup>, 1995), esta última debida al empleo de fertilizantes agrícolas. Las aguas más salinas se localizan en los sectores de Sierra Elvira-Alitaje, aeropuerto Romilla-Láchar y Maracena-Pulianas.

En cuanto a la contaminación de esta zona, la que más se destaca es la por plaguicidas. En estudios realizados en la década de los 80, ya se mencionaban contaminaciones por plaguicidas organoclorados (OCIs) (Acuña<sup>305</sup>, 1981). Augustin<sup>306</sup> en 1983 encuentra también importantes contaminaciones por plaguicidas OCIs en las aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada. Los plaguicidas OCIs presentan una elevada persistencia y hoy en día su uso se halla muy restringido o, incluso,

---

<sup>305</sup> Acuña M.J., *Contaminación por plaguicidas organoclorados en la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 380, 1981

<sup>306</sup> Augustin C., *Contaminación por plaguicidas en aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 378, 1983

prohibido.

En un estudio realizado en aguas de la zona saturada del acuífero entre los años 1993 y 1994 (de la Colina<sup>307</sup>, 1996), sólo se encontraron 10 contaminaciones cercanas o superiores al nivel establecido por la Unión Europea ( $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , Steenhuis<sup>308</sup> *et col.*, 1990), siendo la contaminación más importante por su extensión, la debida al captano. Este plaguicida es un fungicida relativamente polar, de baja solubilidad en agua y se encontró después de una época de lluvias, por lo que probablemente se empleó para prevenir posibles ataques favorecidos por la humedad. También se detectaron contaminaciones puntuales y esporádicas por el herbicida triazínico triazina, durante los meses de verano. Por tanto, la ausencia de contaminaciones por plaguicidas en los trabajos realizados recientemente hace resaltar el poder de depuración de la franja no saturada.

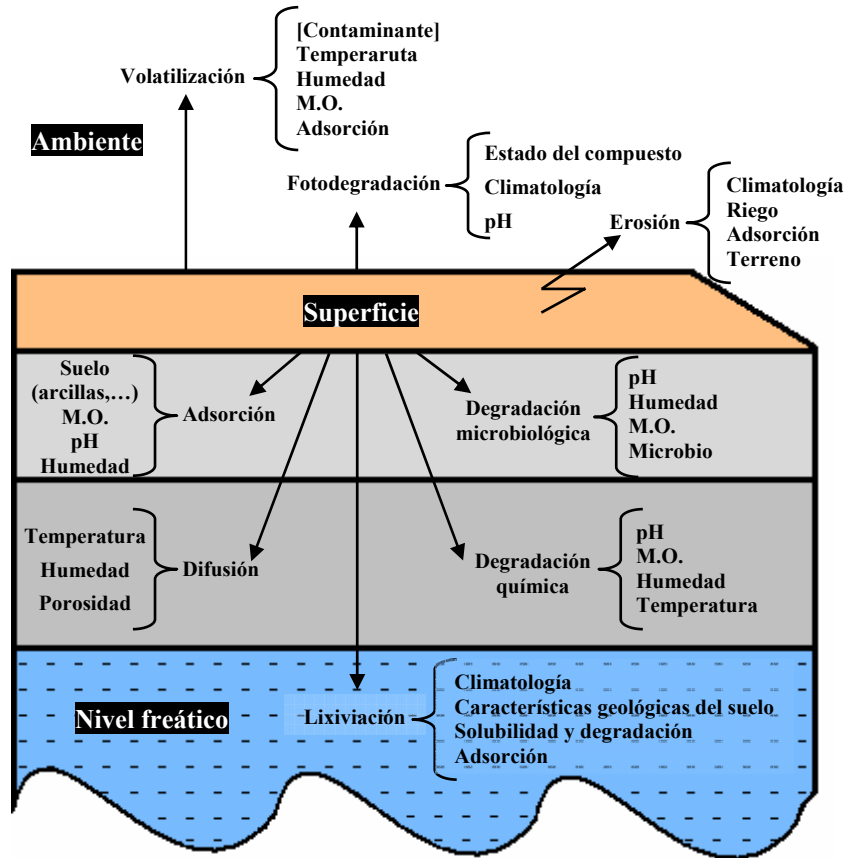
Sin embargo hay que tener en cuenta que la contaminación del acuífero depende de factores externos, no controlables, como el aporte de hídrico que recibe el acuífero y de la cantidad de riego que se aplique en las prácticas agrícolas. El riesgo de contaminación puede ser mayor en estos casos, por lo que los estudios de prevención son importantes para conservar la calidad de las aguas de este acuífero del que, como ya se ha mencionado, se abastece un número importante de habitantes. A continuación, en el siguiente esquema, se indican los factores que pueden alterar el transporte de contaminantes en el suelo, según Flury<sup>309</sup>:

---

<sup>307</sup> de la Colina C., *Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas en aguas. Aplicación al acuífero de la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 303, 1996

<sup>308</sup> Steenhuis T.S., Staubitz W., Andreini M.S., Surface J., Richard T.L., Paulsen R., Pickering N.B., Hagerman J.R., Geohring L.D., *Preferencial movement of pesticides and traces in agricultural soils*. J. Irrig. Drain. Eng. 116; 50-66, 1990

<sup>309</sup> Flury M., *Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. A review*. J. Environ. Qual. 25; 25-45, 1996



*Figura 1.38 - Procesos que afectan al transporte de contaminantes en el suelo*

Así que, el estudio desarrollado en esta Memoria también presenta como finalidad la verificación del comportamiento de un suelo proveniente de esta zona (Vega de Granada) cuando expuesto a una determinada cantidad del tensioactivo sulfonato de alquilbenceno lineal, que como se indicó con anterioridad, es uno de los más ampliamente utilizado, tanto a nivel doméstico como industrial, en la actualidad.



**CAPÍTULO 2**

**EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS**







## 1 - INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se presenta las disoluciones, reactivos, material de laboratorio y la instrumentación que ha sido necesaria para la realización de la parte experimental de la presenta Memoria de Doctorado. También se presenta los tratamientos estadísticos empleados para la calibración y validación de los métodos analíticos desarrollados.

## 2 - DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS

### 2.1 - Disoluciones

Se recogen en este apartado todas las disoluciones utilizadas a lo largo del trabajo experimental.

⇒ **Disolución patrón de mezcla comercial de LAS (Petroquímica Española S.A.) de 1000 ppm en metanol:** El *índice activo* de la mezcla es del 44.05%. La distribución porcentual de los diferentes componentes del LAS se indica en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1** - Distribución de isómeros y homólogos de la mezcla patrón de LAS

Homólogos	Isómeros	% (p/p)
C <sub>10</sub>	5ØC <sub>10</sub>	4.91%
	4ØC <sub>10</sub>	3.63%
	3ØC <sub>10</sub>	2.94%
	2ØC <sub>10</sub>	2.66%

**Tabla 2.1 - Continuación**

Homólogos	Isómeros	% (p/p)
C <sub>11</sub>	5 + 6ØC <sub>11</sub>	14.78%
	4ØC <sub>11</sub>	7.23%
	3ØC <sub>11</sub>	5.67%
	2ØC <sub>11</sub>	5.04%
C <sub>12</sub>	5 + 6ØC <sub>12</sub>	15.38%
	4ØC <sub>12</sub>	5.79%
	3ØC <sub>12</sub>	4.65%
	2ØC <sub>12</sub>	3.92%
C <sub>13</sub>	5 + 6 + 7ØC <sub>13</sub>	13.38%
	4ØC <sub>13</sub>	4.06%
	3ØC <sub>13</sub>	3.19%
	2ØC <sub>13</sub>	2.77%

⇒ **Patrones de isómeros de LAS (Petroquímica Española S.A.).** Los patrones empleados fueron los isómeros 2 fenilo puros de los homólogos pares. La pureza de los patrones se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 2.2 - Pureza de los patrones de isómeros de LAS disponibles**

Isómeros	Pureza (%)
2ØC <sub>8</sub>	97.6
2ØC <sub>10</sub>	98.6
2ØC <sub>12</sub>	98.7
2ØC <sub>14</sub>	88.0
2ØC <sub>16</sub>	90.0

Todos estos compuestos presentan gran solubilidad y estabilidad tanto en medio etanólico como en medio metanólico. La miscibilidad del metanol con agua permite la preparación de disoluciones patrón de concentraciones inferiores en medio acuoso; por tanto, éste ha sido el disolvente seleccionado para preparar las disoluciones patrón de *LAS*.

⇒ **Disolución de 2ØC<sub>8</sub>-LAS, empleado como patrón interno, (Petroquímica Española S.A) de 1000 ppm en metanol.**

Las disoluciones patrón (*LAS*, patrones de isómeros y patrón interno) fueron conservadas en botes de cristal ámbar para evitar la acción de la luz y en el refrigerador a una temperatura de 4 °C. Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la señal fluorescente emitida y se comprobó que no existían diferencias superiores al 5% en la señal emitida por las distintas disoluciones durante un periodo de al menos seis meses.

⇒ **Disolución de ácido clorhídrico (37%, PANREAC) a 4.00 M en metanol-agua (60:40).**

⇒ **Disolución de hidróxido de sodio (PA, PANREAC) a 4.00 M en agua.**

⇒ **Disolución de fenolftaleína (PA, PANREAC) a 0.1% en etanol.**

## 2.2 - Reactivos

Los reactivos que se enumeran a continuación se han empleado como agentes

modificadores de la fase móvil en el sistema cromatográfico. Atendiendo a su naturaleza se pueden clasificar como:

⇒ **Reactivos formadores de pares iónicos**

- Ácido acético glacial (PAI, *PANREAC*).
- Trietilamina (*PANREAC*).
- Acetato amónico (*SIGMA - ALDRICH*).

⇒ **Reactivos con carácter tensioactivo**

- Bromuro de cetilpiridinio (*SIGMA - ALDRICH*) - Tensioactivo catiónico.
- Bromuro de hexadecil trimetil amonio (*SIGMA - ALDRICH*)  
*SIGMA* - Tensioactivo catiónico.
- Tritón X-100 (*SIGMA - ALDRICH*) - Tensioactivo no iónico.
- Dodecilsulfato sódico - SDS - (*FLUKA*) - Tensioactivo aniónico.

⇒ **Otros reactivos**

- Perclorato sódico (PA, *MERCK*).
- $\beta$ -ciclodextrina (*SIGMA - ALDRICH*).

- Formaldehído (37-38%, PA, *PANREAC*). Este reactivo se utilizó para inactivar la acción bacteriana cuando se procesaban las muestras medioambientales.

### 2.3 - Disolventes

- Metanol para HPLC calidad gradiente (*PANREAC*).
- Acetonitrilo para HPLC calidad gradiente (*PANREAC*).
- n-Hexano 96% para HPLC (*SCHARLAU*).
- Diclorometano (PAI, *PANREAC*).
- 2-propanol (PAI, *PANREAC*).
- Tetrahidrofurano - THF - (PAI, *PANREAC*).
- Agua desionizada, obtenida en el equipo de ósmosis inversa Milli RO 12 Plus (*MILLIPORE*) acoplado con un equipo de purificación Milli Q Plus 185 (*MILLIPORE*). La conductividad del agua fue controlada periódicamente, no superando en ningún momento el valor de  $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

## 3 - MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN

En este apartado se menciona todos los materiales de laboratorio y la instrumentación necesaria para la realización de todo trabajo experimental

llevado a cabo en el decorrer de la tesis.

### **3.1 - Material de laboratorio**

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizó el siguiente material:

- Columnas de vidrio de 10.7 cm de largo por 2.5 cm de diámetro interno, para los estudios de adsorción en columna.
- Fritas de vidrio sinterizado nº 3, para los estudios de adsorción en columna, siendo empleadas para evitar pérdidas del relleno del sistema.
- Viales de vidrio de inyección cromatográfica de 2 mL de capacidad.
- Septum de teflón para vial de 2 mL.
- Frascos de plástico (polipropileno) *COMECTA*, con capacidad volumétrica de 80 mL.
- Frasco metálico de forma cilíndrico-cónica (acero inoxidable) usado para el baño de ultrasonido con altura de 13.5 cm, base inferior de 12.0 cm de diámetro interno, base superior de 15.0 cm de diámetro interno y con capacidad volumétrica para 1750 mL.
- Frascos metálicos de forma cilíndrica (acero inoxidable) para realizar

la centrifugación, con capacidad de 125 mL.

- Matraces kitasatos para vacío de diferentes tamaños
- Membranas de filtración 0.22  $\mu\text{m}$  de *PVDF* - Difluoruro de Polivinilidina - (*MILLIPORE*), empleadas para la filtración de las muestras que contenían *LAS*.
- Membranas de filtración 0.45  $\mu\text{m}$  de nylon *MILLIPORE*, empleadas para la filtración de disolventes orgánicos y/o disoluciones reguladoras del pH.
- Equipo de filtración *MILLIPORE* provisto de:
  - Portafiltros analíticos de soporte de vidrio sinterizado.
  - Matraz kitasato para vacío de 500 mL.
- Otros tipos de membranas de filtración como:
  - acetato de celulosa n° 240 *ALBERT*, no estériles, para análisis gravimétrico.
  - fibra de vidrio *NALGENE*, no estériles.
- Barras, pinzas, soportes metálicos.

La limpieza y mantenimiento de todo material empleado a lo largo del trabajo experimental se realizó con mezcla crómica o  $\text{HNO}_3$  al 50% (v/v)

y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada antes de su utilización.

### **3.2 - Instrumentación**

Los instrumentos empleados para la realización de la parte experimental fueron:

#### **3.2.1 - Cromatógrafo de líquidos**

Cromatógrafo de líquidos *AGILENT TECHNOLOGIES 1100 Series*, equipado con:

- Bomba cuaternaria.
- Sistema de desgasificación mediante bomba de vacío.
- Sistema automático de inyección de con volumen variable (de 0.1 - 100  $\mu\text{L}$ ).
- Compartimento termostático para la columna cromatográfica.
- Detector de fluorescencia:
  - Lámpara de descarga modulada de Xenón de 20 W en modo normal y de 5 W en modo económico.
  - Célula de flujo de 8  $\mu\text{L}$ .
  - Monocromadores con intervalos de longitudes de onda de:



- ✧ Excitación: 200 a 700 nm en orden cero.
- ✧ Emisión: 280 a 900 nm en orden cero.
- Rendijas:
  - ✧ Excitación: 20 nm.
  - ✧ Emisión: 20 nm

**3.2.2 - Sonda Ultrasónica Digital, Modelo Sonifier S450D, BRANSON,**  
equipado con:

- Convertidor tipo 102.
- Resonador estándar de 12.7 mm de diámetro.
- Punta enroscable de 12.7 mm de diámetro.
- Sonda de temperatura.
- Micropunta enroscable de diámetro final de 3 mm.

**3.2.3 - Equipo para Extracción en Fase Sólida** integrado por:

- Sistema de vacío múltiple de 12 canales con barómetro incorporado, modelo Visiprep, *SUPELCO*.
- Adaptadores y recipientes de 60 mL de capacidad volumétrica, *SUPELCO*.
- Cartuchos de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> (EC) *ISOLUTE* y C<sub>18</sub>

*MERCK*, ambos de 500 mg y 3 mL de capacidad.

- Cartuchos de extracción en fase sólida *SAX ISOLUTE* y *SAX J. T. BAKER*, ambos de 500 mg y 3 mL de capacidad.

### 3.2.4 - Otros aparatos e instrumentos

- Balanzas Analíticas *METTLER PJ360 Delta Range* y *METTLER AE 163*.
- pH-metro digital *CRISON*, modelo Micro-pH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
- Estufa de secado de 50 - 300 °C, *HEAREUS*.
- Baño de ultrasonido *SELECTA* de 1000 mL de capacidad.
- Placa agitadora-calefactora *HEILDOPH*, modelo 2002.
- Bomba de vacío *SCHOTT IBERICA MZ 2C*, con capacidad de succión de  $1.7 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ .
- Bomba peristáltica *ISMATEC*, con capacidad para 4 canales.
- Arcón congelador y frigorífico *COMERSA*.
- Termostato *B. BRAUN*, modelo Frigomix U plus Thermomix 1441.

- Colector de fracciones *AMERSHAM BIOSCIENCES*, modelo Frac-200, con capacidad para 95 tubos.
- Agitador giratorio *J.P. SELECTA* con capacidad para hasta 8 frascos.
- Agitador de tubos *IKA*, modelo Yellow line TTS 2.
- Tamices metálicos de distintas mallas *MECÁNICA CIENTÍFICA*, con mallas nº 5; nº 14; nº 30 - *ASTM*.
- Barrena tomamuestras de suelos, *EDELMAN*, con diámetro de 7 cm y longitud del bastón de 125 cm.

#### 4 - PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- ***La recogida y tratamiento de los datos del sistema HPLC*** se ha realizado mediante el programa *CHEMSTATION HPLC/HPLC-MS*.
- ***Las estructuras químicas*** se ha dibujado con el programa *CS ChemDraw Pro*, Cambridge Soft Corporation 1985-1997 (1997).
- ***Los programas de cálculo*** utilizados han sido:
  - *Statgraphics Plus 4.1*, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corporation, USA (1999).

- *Microsoft Office Excel 2003 Copyright 1983-2003 Microsoft Corporation (2003).*
- *Alamín<sup>1</sup> (1997).*

## 5 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

### 5.1 - Métodos univariantes

El empleo de la metodología univariante consiste en modificar sólo una variable en cada experimento. Una vez terminada la optimización para esa variable, se procede a repetir el procedimiento con la siguiente.

La manera de proceder ha sido la siguiente:

- Selección de variables influyentes.
- Elección de una de ellas.
- Fijación del resto de variables en un valor determinado.
- Modificación de la variable escogida en un rango adecuado.
- Representación gráfica de la señal obtenida frente a la variable.
- Ajuste de los datos a un modelo adecuado.
- Obtención del óptimo.
- Fijación de esta variable en ese valor.
- Repetición del proceso para otra variable.

### 5.2 - Métodos multivariantes

El empleo de la metodología multivariante se ha extendido bastante en las

---

<sup>1</sup> A.M. García Campaña A.M., Cuadros L., Alés F., Román M., Serra J.L., *ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the turnes by standard addition methodology*. Trends Anal. Chem. 16; 381-385, 1997

últimas décadas por diferentes motivos:

- Proporciona una mayor información del dominio experimental.
- Reduce el número de experiencias.
- Contempla la posible interacción entre variables.

Por una parte hay una reducción del número de experiencias necesarias para la optimización de variables conllevando con esto a un menor coste, menor tiempo de análisis, mayor durabilidad de los instrumentos, etc... Y por otra, el uso de métodos multivariantes de optimización permite un conocimiento más profundo sobre el sistema analítico objeto de estudio.

La forma tradicional para elaborar la optimización de alguna variable en la experimentación química, se basa en el método univariante (uno a la vez), es decir, se fundamenta en el estudio del problema a través de la modificación de las variables una a una, variándose los niveles de una variable (factor) mientras las demás permanecen fijas. Esta metodología presenta algunos inconvenientes puesto que requiere un gran esfuerzo experimental, puede no detectar la existencia de interacción o dependencia entre variables y de presentar un campo de validez restringido y, además, puede llevar en algunos casos a dar interpretaciones erróneas sobre esos óptimos así obtenidos, en el caso de fijar las variables en unos valores determinados “*a priori*” (sin conocer si estos valores son los óptimos para esas variables). Si existe una dependencia entre algunas variables ocurrirá que en función de que la primera tome un valor u otro, se obtendrá un óptimo distinto para la segunda. Pues bien, si esto ocurre, no se podrá utilizar la optimización univariante pues puede llevar a valores de óptimos para las variables equivocadas. La alternativa, es el uso de los métodos multivariantes que permiten conocer si existe o no dependencia entre las

variables del sistema analítico. Además, el hecho de modificar en cada experiencia más de una variable a la vez, puede reducir el número de experiencias necesarias para obtener la misma información o más que en el caso de la optimización univariante.

El empleo de estos métodos multivariantes para detectar dependencias de variables, variables significativas y optimización de variables, implica la realización de uno o varios diseños experimentales.

La metodología a emplear sería:

- Elección del tipo de diseño.
- Selección de los factores y niveles a emplear.
- Obtención de la matriz de experiencias asociada al diseño elegido.
- Adquisición de los datos analíticos.
- Ajuste de los datos obtenidos a un modelo adecuado.
- Comprobación de la ausencia de valores anómalos.
- Idoneidad del modelo propuesto.
- Inspección de efectos significativos.
- Obtención del óptimo en su caso.
- Conclusiones obtenidas.

### **5.2.1 - Diseños experimentales**

Un diseño experimental consiste en el planteamiento de varias experiencias en las cuales se modifica los valores de algunas de las variables presentes en ese diseño con objeto de obtener la mayor información posible del dominio experimental usando el menor número

de experiencias posible. Los diseños se basan en los principios de aleatorización, replicación y homogeneidad de las unidades experimentales.

En cada experiencia (punto experimental) se tiene cada variable (factor) en un valor determinado (nivel) y se genera un valor para de señal (respuesta). La disposición de los factores en sus correspondientes niveles a lo largo de las experiencias generan el diseño experimental. Una vez realizado el diseño y obtenidos los datos correspondientes, se aplica el modelo matemático. Los modelos matemáticos usados son funciones polinómicas de distintos órdenes. El soporte matemático empleado consiste en el establecimiento de un análisis de la varianza (ANOVA), que en resumen, descompone la variabilidad total de los datos obtenidos en fuentes de variabilidad asociadas en este caso a los distintos factores e interacciones. En función del objetivo buscado, se utilizará un modelo de coeficientes para optimizar o un modelo de efectos para ver la influencia de los distintos factores.

Después se debe comprobar que no hay valores anómalos. Se debe indicar que la detección de valores anómalos es diferente a como se hace por ejemplo en la comparación de dos medias. Aquí, no hay valores repetitivos con los factores en los mismos niveles (excepto para el punto central), por lo que no se puede rechazar un valor anómalo sin más, sino que se tiene que repetir esa experiencia. Para detectar anómalos, hay varias posibilidades:

a) *Representación de Daniell:*

Consiste en hacer una representación gráfica de la probabilidad normal de

los efectos, de manera que si hay valores anómalos, aparecerán dos ramas que no pasan por el centro, obteniendo una discontinuidad. La ausencia de anómalos viene determinada por la obtención de una recta sin ramas.

b) Análisis de residuos:

- Inspección visual: La presencia de un posible valor anómalo viene determinada por la aparición de un residuo más grande que el resto. Para ello se hace una representación de los residuales de cada una de las experiencias frente por ejemplo al orden de experiencia. Si se obtiene un punto que se aleja de la distribución normal, se puede tener un anómalo. Pero, para poder desecharlo, lo mejor es utilizar un test estadístico.

- Test estadístico: Se aplica algún test estadístico para ver la existencia de valores anómalos, como la *Q de Dixon*, la *R de Grubbs* o el *criterio t* al residuo más grande. Viendo si el residuo pertenece a la distribución normal formada por el resto de datos, se puede concluir si hay o no anómalo.

c) Reconstrucción del diseño:

Existe otra posibilidad consistente en efectuar una reconstrucción del diseño, para obtener réplicas para cada experiencia (generalmente tres).

### 5.2.2 - Idoneidad del modelo

Se puede verificar la idoneidad del modelo. Básicamente consiste en ver si los datos se ajustan al modelo matemático elegido y en qué grado lo hacen. Esto se puede comprobar por medio de:



- El valor P del *Test de fallo de ajuste*: Considerando un error “ $\alpha = 0.5$ ”, un valor de P mayor del 5%, da un modelo idóneo para los datos.
- El coeficiente de determinación ajustado a los grados de libertad  $R^2$  (variable explicada) y el coeficiente  $Q^2$  (variable predicha). Ambos coeficientes deben estar cerca de la unidad y no deben estar separados por más de 0.2 o 0.3 unidades<sup>2</sup>. En la **Tabla 2.3**, se representa los valores aceptables para cada uno de estos coeficientes en función de la naturaleza de los datos experimentales<sup>3</sup>:

**Tabla 2.3** - Guía general para evaluar los coeficientes  $R^2$  y  $Q^2$

Naturaleza de los datos	$R^2$	$Q^2$
Química	Aceptable: $\geq 0.80$	Aceptable: $\geq 0.50$ Excelente: $> 0.80$
Biológica	Aceptable: $> 0.70$	Aceptable: $> 0.40$

Para cada factor y cada interacción se puede calcular un test estadístico de la *F de Snedecor* basado en la distribución *F de Fischer*, calculado como cociente de la varianza de cada factor o interacción dividido por la varianza del error. Por comparación con la distribución estadística asociada a los grados de libertad correspondientes, se puede indicar si la variabilidad introducida por cada factor es significativa. Es decir, se puede verificar qué factores hay que tener en cuenta ya que alteran en mayor medida la señal e incluso, qué factor o factores no se debe considerar a causa

<sup>2</sup> Eriksson L., Johansson E., Wikström C., *Mixture design-design generation, PLS analysis, and model usage*. Chemom. Intel. Lab. Syst. 43; 1-24, 1998

<sup>3</sup> Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström A., Pettersen J., Bergaman R., *Experimental design and optimization*. Chemom. Intel. Lab. Syst. 42; 3-40, 1998

de que aportan una fuente de variabilidad al sistema pequeña.

La realización de cada diseño en concreto responde a un fin determinado, que genera los tres tipos de diseños existentes:

- Diseños de diagnóstico (*Screening Design*).
- Diseños de superficie de respuesta (*Response Surface Design*).
- Diseños mezcla (*Mixture Design*).

#### **5.2.2.1 - Diseños de diagnóstico**

Estos diseños se emplean para seleccionar los factores más influyentes en un sistema analítico cuando se tiene un número elevado de éstos. Como su nombre indica, diagnostican los factores a tener en cuenta para realizar una optimización. A veces, ocurre que hay un gran número de factores a considerar, que generaría un elevado número de experiencias, cuando además puede ocurrir que varios de esos factores no afecten de forma significativa. Pues bien, en este caso se puede aplicar un diseño de diagnóstico para quedar sólo con aquellos factores que ejerzan una influencia significativa en el sistema analítico.

Los diseños de diagnóstico más empleados son los factoriales completos  $n^2$ . Este tipo de diseños factoriales se expresan mediante una potencia de base 2, donde la base ( $n$ ) indica el número de factores a considerar, el exponente da el número de niveles y, donde el desarrollo de la potencia, da el número de experiencias a realizar. La tabla de experiencias resultante para este tipo de diseños consiste en ir modificando paulatinamente los niveles para cada factor. Ahora, sólo queda obtener las señales correspondientes a cada experiencia.

Una vez realizado el diseño, se procede a su análisis. Lo que se busca, es ver por una parte, la posible dependencia de factores, y por otra, qué factores del total deben ser considerados para un posterior proceso de optimización.

Mediante la realización de un ANOVA, se puede observar si hay dependencia entre los factores considerados. Para ello, se debe calcular los efectos producidos por los distintos factores, y hacer una representación gráfica de estos efectos. Por ejemplo, se puede representar los efectos frente a los factores, obteniendo líneas que representan la variación de la señal producida al modificar un factor para cada uno de los niveles del otro, de manera que si son paralelas se puede decir que no existe interacción. También se puede obtener una única línea que representa la variación del factor considerado, concluyendo que hay efecto si la línea no es horizontal. Además, observando los valores de  $P$  en la tabla ANOVA para las interacciones también se puede verificar si se debe tenerla en cuenta.

Por otra parte, aquellos factores que generen un valor  $P < 5\%$  (Nivel de confianza del 95%) para el estadístico de la  $F$  de *Snedecor* no serán relevantes en el sistema analítico, y se podrá desecharlos al optimizar. Por tanto, sólo se quedará con aquellos que proporcionen un valor de  $P > 5\%$ .

#### **5.2.2.2 - Diseños de superficie de respuesta**

Este tipo de diseños (DSR) se emplea para seleccionar valores óptimos de factores en un sistema analítico concreto. Son diseños más grandes que los de diagnóstico, y que por tanto dan una mayor información del dominio experimental a estudiar. Está claro, que sólo con dos niveles para cada

factor no se obtiene la información suficiente para establecer un valor óptimo determinado. Por ello, se emplean estos diseños de superficie de respuesta.

Son bastante empleados cuando se analizan y modelan problemas en los cuales la respuesta de interés está influenciada por varias variables, siendo el objetivo final el desarrollo, la mejora y optimización de productos y procesos (Lopez<sup>4</sup> *et al.*, 2002; Perez<sup>5</sup>, 2001; Montgomery<sup>6</sup>, 2002; Box<sup>7</sup> *et al.*, 1978).

También se utiliza ampliamente la metodología de superficies de respuesta como una técnica de optimización basada en la utilización de diseños factoriales, introducida por G.E.P. Box en la década de 1950, y viene siendo aplicada con gran éxito al modelado de diversos procesos (Murphy<sup>8</sup> *et al.*, 2004; Soo<sup>9</sup> *et al.*, 2003; Elibol & Ozer<sup>10</sup>, 2002; Kiran<sup>11</sup> *et al.*, 2001; Lindgren<sup>12</sup> *et al.*, 1996; Poon<sup>13</sup>, 1995; Zaid<sup>14</sup> *et al.*, 2003).

<sup>4</sup> López E.A., Sendra J.M.B., Rodríguez L.C., García L.G., Campaña A.M.G., Casado A.M., *Quimiometría: Optimización de un método de análisis químico (9ª edición)*. Curso ofrecido por el Centro de Formación Continua de la Universidad de Granada, 2002

<sup>5</sup> Pérez C., *Estadística práctica con Statgraphics*. Ed. Prentice Hall, p. 691, Madrid, España, 2001

<sup>6</sup> Montgomery D.C., *Diseño y análisis de experimentos*. Ed. Limusa Wiley, p. 686, México, México, 2002

<sup>7</sup> Box G.E.P., Hunter W.G., Hunter J.S., *Statistics for experiments. An introduction to design, data analysis, and model building*. John Wiley & Sons, p-652, New York, USA, 1978

<sup>8</sup> Murphy S.C., Gilroy D., Kerry J.F., Buckley D.S., Kerry J.P., *Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface methodology*. Meat Sci. 66: 689-701, 2004

<sup>9</sup> Soo E.L., Salleh A.B., Basri M., Ralman R.N.Z.A., Kamaruddin K., *Response surface methodological study on lipase-catalysed synthesis of amino acid surfactants*. Process Biochem. 39: 1511-1518, 2004

<sup>10</sup> Elibol M., Ozer D., *Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus**. Process Biochem. 38: 367-372, 2002

<sup>11</sup> Kiran K.R., Manohar B., Divakar S., *A central composite rotatable design analysis of lipase catalysed synthesis of lauryl lactic acid at bench-scale level*. Enzyme Microb. Technol. 29: 122-128, 2001

<sup>12</sup> Lindgren A., Sjöström M., Wold S., *PLS modeling of detergency performance for some technical nonionic surfactants*. Chemom. Intel. Lab. Syst. 32: 11-124, 1996

<sup>13</sup> Poon G.K.K., *Sequential experimental study and optimisation of an acid cooper pattern plating process*. Circ. World 22: 7-13, 1995

<sup>14</sup> Zaid T.A., Bensari L., Benmaza K., Chitour C.E., Canselier J.P., *Response surface methodology as an approach to optimization of a dishwashing detergent*. Comunicación presentada en las 33 Jornadas del Comité Español de Detergencia

Los diseños más empleados son los factoriales completos con réplicas del punto central, los cúbicos centrados en las caras, en estrella, Doehlert, etc... La elección de un tipo de diseño u otro dependerá mucho del sistema analítico concreto y del conocimiento previo que se tenga sobre el sistema y los diseños existentes.

La metodología a seguir sería la siguiente:

- Estimar los coeficientes del modelo.
- Comprobar el modelo.
  - Ajuste del modelo teórico a los datos experimentales.
  - Estimar el error.
- Estudio de la superficie de respuesta estimada.
- Obtención de los valores óptimos.

### **5.2.2.3 - Diseños mezcla**

La forma de trabajar en los diseños mezcla es distinta a los tipos anteriores, debido a una serie de restricciones que poseen estos diseños. La primera es que el intervalo de variación de los factores (que ahora siempre será composiciones en tanto por uno) es de 0 a 1, y la segunda que la suma de todas las composiciones debe dar uno. Es decir, que hay relaciones de ligadura entre esas composiciones. Esto hace que los valores que pueden tomar los factores sean menores que en los otros tipos de diseños. De nuevo, los modelos matemáticos son funciones polinómicas de grado 1, 2 o 3 generalmente. Pero, debido a las restricciones anteriormente comentadas, las funciones polinómicas no poseen los términos puros. Así que, para obtener el máximo, en vez de aplicar el

criterio de *Lagrange*, se emplea la regla de la palanca sobre un mapa de contorno de la superficie.

## 6 - CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos. Por tanto, para obtener la concentración de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la medida física con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos *proceso de calibración química*. Es por ello que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo se puede obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

⇒ ***Etapas de calibración.*** En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente (señal analítica) con la variable independiente (concentración).

$$\text{Señal analítica} = f(\text{concentración}) \quad (2.1)$$

⇒ ***Etapas de predicción.*** Consiste en obtener las variables independientes, es decir, las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido para la variable dependiente. El valor de la variable independiente correspondiente a muestras patrón junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

Dentro del campo de la Química Analítica los modelos de calibración más utilizados son de regresión univariante. Estos modelos se caracterizan por la existencia de una variable independiente (concentración) que se relaciona con la respuesta (señal instrumental) mediante una relación lineal. La relación funcional que se establece entre ambas variables, se ajusta a un modelo matemático del tipo:

$$Y = a + b \cdot X \quad (2.2)$$

donde  $Y$  es la variable dependiente,  $X$  la independiente, y  $a$  y  $b$  dos parámetros estimados a partir de los datos experimentales.

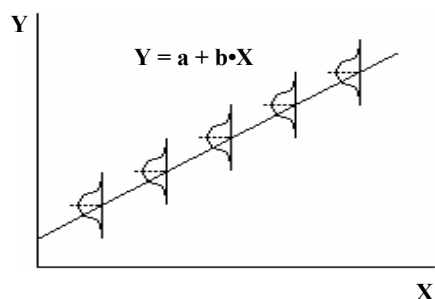
De todos los modelos de regresión, el que ajusta los valores experimentales por medio del algoritmo gaussiano de hacer mínimo el cuadrado de los residuales, es el más frecuentemente usado para el establecimiento de la ecuación de la recta de calibrado. La aplicación de este algoritmo implica el cumplimiento de determinadas condiciones que puedan garantizar la validez del modelo de regresión univariante, siendo estas condiciones las siguientes:

- 1) La existencia de la aleatoriedad de las muestras.
- 2) La relación entre la variable independiente y la variable dependiente, concentración y señal analítica, respectivamente, será lineal en todo el rango de aplicabilidad (linealidad).
- 3) Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la señal instrumental. Esto significa que la variable concentración no debe ser aleatoria, es decir que esté medida sin error o su error aleatorio sea

despreciable frente a la respuesta. En la práctica este error se minimiza con el empleo de sustancias patrón.

4) Los errores en la respuesta deben presentar una distribución normal (normalidad), es decir, deben ser independientes entre sí, estar distribuidos por igual y su media sea cero, lo que implica que, para cada concentración de analito, la dispersión de las medidas de la señal analítica debe ser la misma e independiente de dicha concentración. De esta forma, se establece una única desviación estándar,  $S_{y/x}$  como representativa de la dispersión de la señal analítica para todo el rango dinámico lineal de concentración de analito, condición esta a la que se denomina homogeneidad de varianza o homocedasticidad.

En la **Figura 2.1** se muestra un modelo de regresión lineal univariante.



**Figura 2.1** - Ilustración gráfica del modelo de regresión lineal

### 6.1 - Rechazo de valores anómalos

Tras la obtención de cualquier dato experimental hay que tener en cuenta que antes de considerarlo se debe verificar su idoneidad puesto que puede haber algún valor considerado anómalo. Para esta finalidad se puede



recurrir al test estadístico que se emplea para el rechazo de valores anómalos, denominado *Prueba de la Q*<sup>15</sup>. Dicho test se lleva a cabo de la siguiente manera:

1) Se ordenan los datos a estudiar en orden ascendente para seleccionar el valor discordante y su vecino más cercano.

2) Se calcula la diferencia entre el valor anómalo y el valor más cercano; y la dispersión completa de la serie restando al valor más alto el valor más bajo.

3) A continuación se divide el valor absoluto de la primera diferencia entre la dispersión de la serie para obtener el valor de  $Q_{cal}$  y se compara con el valor de  $Q$  tabulado para un nivel de significación del 5% y para  $(n-1)$  grados de libertad, siendo  $n$  el número total de valores obtenidos. Las hipótesis consideradas en este test son:

Valor no anómalo  $Q_{cal} < Q_{tab} \Rightarrow$  hipótesis nula ( $H_0$ )

Valor anómalo  $Q_{cal} \geq Q_{tab} \Rightarrow$  hipótesis alternativa ( $H_1$ )

## 6.2 - Función de calibración

El modelo de calibración seleccionado fue el linear de regresión univariante por mínimos cuadrados. La estimación de los parámetros  $a$  y  $b$  del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función lineal de calibración. Se parte para ello, de una serie de  $n$  pares de valores experimentales correspondientes a las concentraciones y señales

---

<sup>15</sup> Dean R.B., Dixon W.J., *Simplified statistics for small numbers of observations*. Anal. Chem. 23; 636-638, 1951

analíticas, y se les aplica el método de mínimos cuadrados.

Si se supone el cumplimiento de la condición de homocedasticidad, el método de mínimos cuadrados proporciona las estimaciones de los parámetros  $a$  y  $b$  más precisas entre las veraces. Los intervalos de confianza de la pendiente ( $b$ ) y la ordenada en el origen ( $a$ ) se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\begin{array}{ll} \text{Ordenada en el origen} & a \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_a \\ \text{Pendiente} & b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_b \end{array}$$

donde  $t_{\alpha, n-2}$  es el valor del estadístico *t-Student* para un nivel de significación  $\alpha$  determinado y  $n-2$  grados de libertad, y  $S_b$  y  $S_a$  son las desviaciones estándar correspondientes a la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente. A lo largo de esta tesis, se utiliza un nivel de significación del 5%.

La verificación de las hipótesis del modelo en un problema particular es clave para establecer la validez de dicho modelo y, para lograrla, hay que asumir, evidentemente, la aleatoriedad de las muestras, parámetro controlado por una planificación correcta de la experiencia de calibrado, como también, la normalidad de los datos.

Para comprobar la tendencia lineal de los datos, en esta tesis se ha optado por la evaluación del *fallo de ajuste* de los datos homocedásticos al modelo. El test se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de algunas de las parejas de

datos. Este test compara el valor del estadístico  $F$ , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste  $MS_{FA}$  y al error puro  $MS_{PE}$ , con los valores tabulados para un determinado nivel de significación  $\alpha$ , fijado en el 5% y con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad, siendo  $k$  el número de patrones de calibración diferentes y  $n$  el número total de observaciones. Esta condición será evaluada mediante el cálculo del valor  $P_{lof}$  del test de fallo de ajuste. Si  $P \geq 5\%$  se concluirá por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

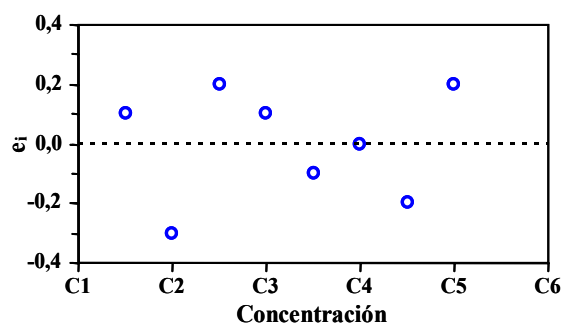
Finalmente, se estudia la homogeneidad de varianzas, es decir, la condición de homocedasticidad. Para comprobar esta hipótesis, se empleó el *análisis gráfico de los residuos*, según propone Boqué & Rius<sup>16</sup>, definiendo como residuo la distancia vertical desde cada punto experimental al valor que le correspondería mediante la recta de regresión estimada por mínimos cuadrados. Normalmente se realizan representaciones gráficas de los residuos frente a las respuestas calculadas por el modelo o frente a la variable independiente (concentración). En esta Memoria se ha hecho uso de esta segunda opción, es decir, la representación gráfica de los residuos frente a los valores de concentración. De la observación de estas gráficas, puede evaluarse el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos y detectarse la presencia de valores anómalos, para ello se debe cumplir que sea igual el número de residuos positivos y negativos encontrado, que haya aleatoriedad en la distribución y se obtengan valores similares entre los residuales.

La **Figura 2.2** representa una distribución ideal del tipo de los residuales

---

<sup>16</sup> Boqué R., Rius F.X., *Avances en Quimiometría Práctica*, Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España, 1994

(que son la diferencia entre los valores predichos y los experimentales) frente a la concentración.



*Figura 2.2 - Distribución de los residuales frente a la concentración (condición de homocedasticidad)*

### 6.3 - Parámetros de calidad del método analítico

Los parámetros de calidad establecidos a lo largo de esta tesis fueron los siguientes:

- **Rango dinámico lineal y Linealidad**
- **Precisión**
- **Sensibilidad o Resolución analítica**
- **Límites de detección y cuantificación**

#### 6.3.1 - Rango dinámico lineal y Linealidad

El rango dinámico lineal viene definido por el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado el método analítico y por el límite de cuantificación de dicho método. Por otra parte, la linealidad

indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado<sup>17</sup>. Se pueden distinguir dos tipos de linealidad:

- La linealidad “*en línea*”(in-line) se corresponde con el valor  $P$  del fallo de ajuste.

- La linealidad “*sobre la línea*”(on-line), que se define como el propio coeficiente de correlación ( $r$ ), o como el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), sin embargo valores de ( $r$ ) muy próximos a la unidad no indican necesariamente una alta calidad de los datos analíticos. También se puede emplear la desviación estándar relativa de la pendiente,  $DER_{(b)}$ , que se calcula por el cociente del valor de la desviación estándar de la pendiente ( $S_b$ ) entre la pendiente ( $b$ ), como medida matemática de la linealidad. De esa forma la linealidad viene dada por la ecuación 2.3:

$$\text{LIN (\%)} = [1 - \text{DER}_{(b)}] \cdot 100 \quad (2.3)$$

donde  $S_b$  es la desviación estándar relativa de la pendiente de la función de calibrado.

El valor máximo de linealidad será por tanto del 100%, de forma que cuanto más próximo esté el valor calculado para este parámetro a dicho valor, mayor será el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal propuesto.

### 6.3.2 - Precisión

Este parámetro mide el grado de incertidumbre que se puede esperar de los

---

<sup>17</sup> Analytical Methods Committee. *Is My Calibration Linear?* Analyst 119; 2363-2366, 1994

resultados analíticos obtenidos a partir del calibrado.

Para evaluar la precisión del método analítico se estudió la fluctuación de la señal analítica correspondiente a una serie de disoluciones de concentración igual al punto central del rango dinámico lineal. De forma que la precisión vendrá estimada por el valor de la desviación estándar relativa (*DER*) de dicha señal, calculada según la ecuación 2.4:

$$DER = \left( \frac{s}{y} \right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

donde *s* es la desviación estándar de las señales medidas, e *y* es la señal analítica media.

### 6.3.3 - Sensibilidad o Resolución analítica

La sensibilidad de un método analítico se puede definir como la derivada de la magnitud analítica dependiente de la concentración del analito, respecto de dicha concentración. Así, se acepta como valor de la sensibilidad el de la pendiente de la función de calibrado, denominada según la *IUPAC*, sensibilidad del calibrado<sup>18</sup>.

Sin embargo, la medida de la sensibilidad no debe limitarse únicamente al cálculo de la pendiente de la función de calibrado, ya que las dispersiones originadas en el proceso de calibración, influirán notablemente sobre la misma. Así, Mandel y Stiehler<sup>19</sup> proponen que la sensibilidad analítica

<sup>18</sup> IUPAC, *Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. Analytical chemistry division*. Spectrochim. Acta B 33; 241-245, 1978

<sup>19</sup> Mandel J., Stiehler R.D., *Sensitivity - A criterion for the comparison of methods of test*. J. Res. Natl. Bur. Std. 53, 155-159, 1954

vendrá definida por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ( $S_{R,C}$  o  $S_{y/x}$ ) y la pendiente del calibrado ( $b$ ), según se muestra en la ecuación 2.5:

$$S_{\text{analítica}} = \left( \frac{S_{y/x}}{b} \right) \quad (2.5)$$

La desviación estándar de la regresión se calcula a partir de la ecuación 2.6:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (2.6)$$

donde  $S_{y/x}$  es la desviación estándar de la regresión,  $y_i$  es la señal analítica experimental obtenida para cada valor de concentración,  $\hat{y}_i$  es el valor de la señal calculada en la recta de regresión correspondiente a la concentración  $c$ , y  $n$  es el número total de pares de puntos usados para el cálculo de la recta de calibrado.

#### 6.3.4 - Límites de detección y cuantificación

Se puede definir el límite de detección de un método analítico como la menor concentración ( $C_L$ ) o cantidad del compuesto ( $q$ ) que puede ser detectada con un nivel de confianza determinado. Son varias las metodologías empleadas para la determinación del límite de detección del método analítico. A continuación, se describen algunas de estas metodologías.

a) Metodología basada en el tratamiento de la señal del blanco<sup>18</sup>:

Según esta metodología, al límite de detección, expresado como  $C_L$ , le corresponde una señal analítica que viene definida por la expresión 2.7:

$$X_L = X_B + k \cdot S_B \quad (2.7)$$

donde  $X_B$  es el valor medio de la respuesta del blanco;  $S_B$  la desviación estándar de dicha señal y  $k$  un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración  $C_L$  está relacionada con el valor de  $X_L$  según la expresión 2.8:

$$C_L = \frac{(X_L - X_B)}{b} \quad (2.8)$$

donde  $b$  es la pendiente de la función de calibrado.

Sustituyendo la ecuación 2.7 en 2.8 se obtiene que el límite de detección vendrá dado por:

$$C_L = \frac{k \cdot S_B}{b} \quad (2.9)$$

Este valor  $C_L$  será un fiel reflejo del límite de detección del método, siempre que  $b$  esté bien definida.

Como regla general, se suele usar el valor  $k = 3$  que proporciona un nivel de



confianza del 99.86%, asegurándose así que la magnitud analítica  $X_L > X_B + 3 \cdot S_B$  sea debida a la presencia de analito en la muestra problema y no a las fluctuaciones del blanco.

Para calcular la desviación estándar correspondiente al blanco, se obtiene la señal analítica correspondiente a diez disoluciones blanco, empleando las condiciones instrumentales establecidas para cada método.

Por otra parte, el límite de cuantificación se define como la concentración de analito que corresponde a una señal analítica  $X_Q$ , definida por la ecuación 2.10:

$$\mathbf{XQ = XB + k \cdot SB} \quad (2.10)$$

Por tanto, y siguiendo un razonamiento similar al anterior, la concentración correspondiente a este límite de cuantificación vendrá dada por la siguiente expresión:

$$\mathbf{C_Q = \frac{k \cdot S_B}{b}} \quad (2.11)$$

recomendándose en este caso el valor mínimo de 10 para la constante  $k$ .

b) Metodología basada en la recta de calibrado<sup>20</sup>:

Esta metodología se basa en una estimación por extrapolación de la recta

---

<sup>20</sup> Cuadros L., García A., Jiménez C., Román M., *Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment*. Anal. Letter, 26; 1243-1258 1993

de calibrado. En primer lugar, se determina la desviación estándar de la regresión a partir de la ecuación 2.6.

A partir del valor de la desviación estándar de la regresión se puede determinar la desviación estándar de la ordenada en el origen,  $S_a$ , y la desviación estándar de la pendiente,  $S_b$ . Las expresiones para este cálculo vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum c_i^2}{n \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.12)$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.13)$$

La desviación estándar de la estimación de la concentración,  $S_c$ , se puede determinar a partir de la ecuación 2.14:

$$S_c = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.14)$$

donde  $m$  es el número de repeticiones del análisis;  $n$  es el número total de valores utilizados en la regresión lineal;  $y$  es la media aritmética de los valores obtenidos para  $m$  análisis;  $\bar{y}$  es la media aritmética de todos los valores usados en la regresión lineal;  $c_i$  es cada una de los valores de concentración del análisis; y  $\bar{c}$  es la media aritmética de todos los valores de concentración usados para la calibración. El valor de  $S_c$  depende del número de puntos de la calibración y del número de réplicas, y podría

minimizarse haciendo  $m$  igual a  $n$ .

Basándose en la expresión **2.14**, la desviación estándar del blanco,  $S_o$ , vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.15)$$

donde  $y_o$  es la señal correspondiente al blanco.

Teniendo en cuenta las ecuaciones **2.5** y **2.13**, la ecuación **2.15** se puede simplificar para obtener:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \text{D.E.R.}(\mathbf{b}) \cdot d_o^2} \quad (2.16)$$

donde  $d_o$  viene dado por la expresión  $(y_o - \bar{y})$ .

También se puede determinar el límite de detección solamente llevando en consideración la desviación estándar de los residuales  $S_{y/x}$ , la pendiente  $b$ , y estimando por extrapolación de la desviación estándar del blanco,  $S_o$ :

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\left(\frac{n-2}{n-1}\right)} \quad (2.17)$$

donde  $n$  es el número total de valores utilizados en la regresión lineal.

Con estos datos, se calcularía los límites de detección y cuantificación

aplicando las siguientes ecuaciones:

$$X_L = 3 \cdot S_0 \quad (2.18)$$

$$X_Q = 10 \cdot S_0 \quad (2.19)$$

c) Metodología basada en la relación señal/ruido:

La base de la metodología en función de la relación señal/ruido fue introducida por Kaiser<sup>21</sup> en 1970, y desarrollada posteriormente en los años ochenta por Sharif<sup>22</sup> y colaboradores. Se basa en la estimación del ruido analítico, el cual se determina llevando a cabo la medida cromatográfica de 10 disoluciones sin analito. Para cada uno de estos cromatogramas se haya una media de la señal con su correspondiente desviación estándar. Por último, se hace la media de estos resultados y se haya una desviación estándar de estos resultados. El límite de detección vendrá dado por la expresión 2.7:

$$X_L = X_B + k \cdot S_B \quad (2.7)$$

donde  $X_B$  es la media calculada,  $k = 3$ , y  $S_B$  es la desviación estándar antes determinada.

d) Metodología basada en la señal del “blanco cromatográfico”<sup>23</sup>:

Esta metodología ha sido desarrollada por Vilchez y colaboradores. Según

---

<sup>21</sup> Kaiser, H., *Report for analytical chemists. II. Quantitation in elemental analysis*. Anal. Chem. 42; 26-59, 1970

<sup>22</sup> Sharaf M.A., Illman D.L., Kowalski B.R., *Chemometrics*, Ed. Wiley, New York, USA, 1986

<sup>23</sup> González A., Cuadros L., Alonso E., Vilchez J.L., *Estimate of gas Chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC*. J. Chrom. A, 726; 133-139, 1996

estos autores, el calibrado correspondiente a un método cromatográfico se caracteriza por la ausencia de señal analítica correspondiente al blanco, lo cual imposibilita el cálculo del límite de detección de forma similar a la empleada para métodos espectroscópicos de análisis, y por ello se ha recurrido a lo largo del tiempo a otros procedimientos como son el estudio de la mínima cantidad detectable<sup>24,25</sup>, uso del término independiente de la ecuación de calibrado<sup>26</sup>, cálculo de propagación de errores<sup>27</sup> o estimación aproximada por extrapolación de la recta de calibrado<sup>20</sup>. Métodos que presentan numerosos problemas de tipo práctico y determinan una gran arbitrariedad en la estimación del límite de detección en cromatografía.

La propuesta realizada con objeto de evitar estos inconvenientes consiste en obtener la señal del "blanco cromatográfico" por integración directa del ruido de fondo, utilizando como límites de integración el valor extrapolado de anchura de pico ( $W_b$ ) a concentración "cero". Se necesita, por tanto, conocer la variación de la anchura de pico con respecto a la concentración de analito. Para determinar esta anchura, se propone la medida de un parámetro libre de la aleatoriedad del ruido de fondo como es la anchura a mitad de pico  $W_{0.5h}$ , y a partir de este valor calcular  $W_b$ , considerando que el pico cromatográfico tiene un perfil Gaussiano<sup>28</sup>.

Partiendo de la expresión de una Gaussiana, adaptada al caso de los parámetros cromatográficos (**Figura 2.3**), la altura del pico a su tiempo de

<sup>24</sup> Snyder L.R., *Practical HPLC methods development*, Ed. Wiley, Chichester, UK, 1988

<sup>25</sup> Merken H.M., Beecher G.R., *Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones*. J. Chrom. A, 897; 177-184; 2000

<sup>26</sup> Miller J.M., *Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review*. Analyst 116; 3-149, 1991

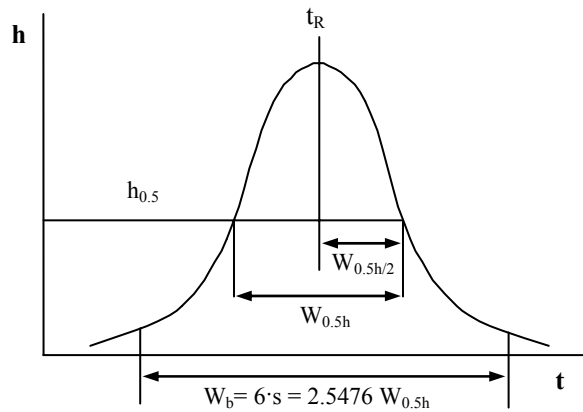
<sup>27</sup> Long G.L., Winefordner, J.D., *Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition*. Anal. Chem. 55; 712-724, 1983

<sup>28</sup> Klinkenberg A., Sjenitzer F., *Retention-time distributions of the gaussian type*. Chem. Engin. Sci. 5; 258-270, 1956

retención viene dada por la ecuación 2.20:

$$h = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(t-t_R)^2}{s^2}} \quad (2.20)$$

donde  $h$  es la altura de pico al tiempo de retención  $t_R$ , y  $s^2$  es la varianza del pico.



**Figura 2.3** - Parámetros característicos de un pico Gaussiano

Aplicando la expresión 2.20 a los parámetros de pico correspondientes se demuestra que la desviación estándar de pico viene dada por la expresión:

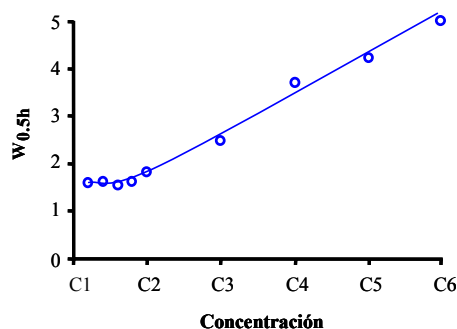
$$s = \frac{W_{0.5h}}{2} \sqrt{\frac{1}{2 \ln \frac{1}{\sqrt{2\pi h_{0.5}}}}} \quad (2.21)$$

donde  $W_{0.5h}$  es la anchura a mitad de pico y  $h_{0.5}$  es la mitad de la altura del pico Gaussiano.

El valor de  $W_b$  para un 99.73% del área de pico<sup>29</sup>, vendrá dada por un valor igual a  $6 \cdot s$ :

$$W_b = 6 \cdot s = 2.548 \cdot W_{0.5h} \quad (2.22)$$

Para calcular la anchura de base a concentración "cero" ( $W_{b0}$ ), dado que las dimensiones del pico cromatográfico, altura y anchura, dependen de la concentración del compuesto, se extrapola la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de  $W_{0.5h}$  frente a la concentración correspondiente. En la **Figura 2.4** se muestra de forma gráfica el comportamiento típico de esta variable.



**Figura 2.4** - Variación de la anchura de pico con la concentración

En primer lugar, se determina el valor de la anchura a mitad de pico ( $W_{0.5h}$ ) correspondiente a concentración "cero", extrapolar la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de  $W_{0.5h}$  de diferentes picos frente a la correspondientes concentraciones de analito (**Figura 2.4**). A continuación se calcula el valor de  $W_{b0}$  aplicando la ecuación **2.22** y finalmente, se mide la señal del blanco para cada

<sup>29</sup> Dyson N., *Chromatographic Integration Methods*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1990

compuesto por integración sobre la línea del cromatograma del blanco en el intervalo  $t_R \pm 0.5 W_{b0}$ , donde  $t_R$  es el tiempo de retención correspondiente a cada compuesto considerado. Para realizar réplicas se requiere una nueva inyección y el establecimiento de un nuevo cromatograma.

## 7 - VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para llevar a cabo la validación de los diferentes métodos analíticos propuestos en esta Memoria se han aplicado dos protocolos estadísticos distintos. Por una parte se han llevado a cabo estudios realizando ensayos de recuperación; y también, se ha aplicado el protocolo estadístico propuesto por Cuadros<sup>30</sup> y colaboradores y denominado metodología de adición de patrón en el que se compara el calibrado con patrones y con adición de patrón y se introduce el concepto de blanco de Youden.

### 7.1 - Ensayos de recuperación

Se lleva a cabo ensayos de recuperación en el que se calcula el porcentaje de recuperación (*Rec*) obtenido de muestras reales en las que se ha adicionado una determinada cantidad del compuesto en estudio (muestra fortificada). Es necesario también analizar muestras sin haberlas fortificadas (muestra no fortificada). Tras aplicar el método analítico, se relacionan las concentraciones encontradas en las muestras fortificadas, en las de la muestra-blanco y con la concentración añadida. El cálculo se realiza según la ecuación **2.23**:

---

<sup>30</sup> Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Alés F., Jiménez C., Román M., *Validation of an analytical method using the standard addition methodology*. J. AOAC Int. 78; 471-476, 1995



$$\text{Rec}(\%) = \frac{C_{\text{muestra fortificada}} - C_{\text{muestra no fortificada}}}{C_{\text{adicionada}}} \cdot 100 \quad (2.23)$$

## 7.2 - Metodología de adición de patrón

Esta metodología propuesta por Cuadros<sup>30</sup> y colaboradores implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones (*CP*), un calibrado de adición de patrón (*CA*) y otro calibrado empleando porciones crecientes de muestra, denominado calibrado de Youden (*CY*). La metodología de adición de patrón se puede aplicar para resolver diferentes problemáticas:

- ⇒ Determinación de analitos en muestras en las que las interacciones analito-matriz conducen a resultados inexactos al emplear la calibración con patrones.
- ⇒ Determinación de analitos, cuyo contenido en muestra es inferior al límite de cuantificación del método, pero superior a su sensibilidad analítica.
- ⇒ Comprobación de la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia.

Para verificar la exactitud del método hay que desarrollar el cálculo estadístico que se esquematiza a continuación:

- 1) Se realiza un ajuste por mínimos cuadrados de los tres calibrados (*CP*, *CA* y *CY*). De todos los parámetros estadísticos derivados de este ajuste se

selecciona  $n$  (número de parejas de datos),  $a$  (ordenada en el origen),  $b$  (pendiente) y  $S_{y/x}$  (desviación estándar del calibrado).

2) Se compara mediante un test de *F de Snedecor* las varianzas del calibrado con patrones y del calibrado de adición de patrón. Las hipótesis consideradas en este test son:

Varianzas iguales  $S_1^2 = S_2^2$   $F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow$  hipótesis nula ( $H_0$ )

Varianzas distintas  $S_1^2 \neq S_2^2$   $F_{cal} \geq F_{tab} \Rightarrow$  hipótesis alternativa ( $H_1$ )

Este test compara un valor del estadístico *F calculado* según la ecuación 6.18 con un valor tabulado para  $(n_1 - 2)$  y  $(n_2 - 2)$  grados de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de puntos experimentales de cada una de las funciones de calibrado:

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2}; (s_1 > s_2) \quad (2.24)$$

donde  $S_1^2$  y  $S_2^2$  representan las varianzas de los residuos para ambas rectas de calibrado (con patrones y adición de patrón).

3) Se realiza el test de comparación de pendientes para comprobar si la adición de patrón provoca un error sistemático constante, o sea que la recta de adición de patrón está desplazada paralelamente respecto a la recta del calibrado con patrones. Para lo cual se realiza el test de la *t-Student*. Se calcula el estadístico  $t_{cal}$  para  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad. Se acepta la hipótesis nula para un nivel de significación mayor del 5%.

Si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos  $t$  será calculado según la ecuación 2.25:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{\sum(c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum(c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (2.25)$$

donde  $S_1$  y  $S_2$  representan los valores de la desviación estándar de la regresión para  $CP$  y  $CA$ , respectivamente.

El valor de  $t$  calculado se compara con un valor de  $t$  tabulado para un nivel de significación del 5% y  $f$  grados de libertad, calculados según la expresión 2.26:

$$f = \frac{\frac{S_1^2}{\sum(c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum(c_2 - \bar{c}_2)^2}}{\frac{S_1^2 / \sum(c_1 - \bar{c}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{S_2^2 / \sum(c_2 - \bar{c}_2)^2}{n_2 - 2}} \quad (2.26)$$

Si no existe diferencia significativa entre las varianzas se calcula la desviación estándar ponderada de regresión ( $S_p$ ) a partir de las correspondientes desviaciones estándar del calibrado con patrones ( $S_1$ ) y adición de patrón ( $S_2$ ):

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_1^2 + (n_2 - 2)S_2^2}{n_1 + n_2 - 4}} \quad (2.27)$$

donde  $n_1$  y  $n_2$  son el número de datos experimentales de cada uno de los calibrados.

El estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_1^2} + \frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_2^2}}} \quad (2.28)$$

El valor de  $t_{cal}$  se compara con el valor de  $t_{tab}$  con  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad y con un nivel de significación del 5%. Las hipótesis a tener en cuenta son las siguientes:

Pendientes iguales  $b_1 = b_2$   $t_{cal} < t_{tab} \Rightarrow$  hipótesis nula ( $H_0$ )

Pendientes distintas  $b_1 \neq b_2$   $t_{cal} \geq t_{tab} \Rightarrow$  hipótesis alternativa ( $H_1$ )

- Una vez comprobado que la pendiente del calibrado con patrones es igual a la pendiente del calibrado con adición de patrón, se calcula la pendiente promedio:

$$b_p = \frac{\sum (c_i - \bar{c})_1 (y_i - \bar{y})_1 + \sum (c_i - \bar{c})_2 (y_i - \bar{y})_2}{\sum (c_i - \bar{c})_1^2 + \sum (c_i - \bar{c})_2^2} \quad (2.29)$$

- Se calculan las nuevas ordenadas en el origen ( $a'$ ) para el calibrado con patrones ( $a'_1$  o  $a'_{CP}$ ) y para el calibrado con adición de patrón ( $a'_2$  o  $a'_{CA}$ ) a partir del valor de pendiente promedio. A continuación, se compara la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones ( $a'_{CP}$ ) con la ordenada en el origen del calibrado de Youden ( $a_Y$  o  $a_{CY}$ ), si hay diferencia

entre ambas será debida a la existencia de error sistemático por efecto matriz de la muestra. En este caso no se puede realizar un test de comparación de  $a'_{CP}$  y  $a_{CY}$  porque ambas están obtenidas a partir de variables independientes distintas. Para compararlas se comprueba que  $a_{CY}$  está incluido en el intervalo de confianza de  $a'_{CP}$ . Se utiliza un valor de *t-Student* con  $(n_1 - 2)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5%. Si  $a_{CY}$  no está incluido en el intervalo calculado, se obtiene el verdadero blanco de muestra denominado blanco de Youden:

$$\mathbf{a}'_{CA} = \mathbf{R}_{CA} - \mathbf{b}_p \cdot \mathbf{C}_{CA} \quad ; \quad \mathbf{a}'_{CP} = \mathbf{R}_{CP} - \mathbf{b}_p \cdot \mathbf{C}_{CP} \quad (2.30)$$

Intervalo de confianza de la ordenada en el origen,  $a'_{CP}$ :

$$\mathbf{a}_{CY} \in \mathbf{a}'_{CP} \pm t_{\alpha} S_p \sqrt{\frac{\sum \mathbf{c}_{i,CP}^2}{n \sum (\mathbf{c}_{i,CP} - \bar{\mathbf{c}})^2}} \quad (2.31)$$

$a_Y$  - blanco de Youden:

$$\mathbf{a}_Y = \mathbf{a}_{CY} - \mathbf{a}'_{CP} \quad (2.32)$$

- Finalmente, se comprueba la exactitud del método analítico. Para ello se compara el contenido de analito en la disolución ( $C_x$ ) calculado a partir del calibrado con patrones ( $C_{x,1}$  o  $C_{CP}$ ) y el calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $C_{x,2}$  o  $C_{CA}$ ). Ambos valores ( $C_{CP}$  y  $C_{CA}$ ) se comparan mediante un test de *t-Student* de comparación de dos medias con  $(n_1 + n_2 - 3)$  grados de libertad. Si concluimos por la hipótesis nula con un nivel de significación mayor del 5%, ambos resultados son iguales y por tanto el método es exacto. Se calcula el estadístico:

$$t(c) = \frac{|c_{x,1} - c_{x,2}|}{\frac{S_P}{b_P} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} - \frac{(y_1 - y_2)^2}{b_P^2 [\sum (c_{i,1} - c_1)^2 + (c_{i,2} - c_2)^2]}}} \quad (2.33)$$

Estos parámetros fueron calculados en todos los casos con ayuda del programa informático Alamin<sup>1</sup>.



### **CAPÍTULO 3**

## **DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS ACUOSAS**







## **1 - INTRODUCCIÓN**

En el presente Capítulo se propone la metodología analítica para la determinación de LAS en muestras acuosas. Ha sido aplicada a matrices medioambientales utilizadas en esta Memoria como agua de pozo y aguas residuales.

En el apartado inicial se discuten los diferentes estudios realizados sobre los principales parámetros cromatográficos que atañen a la determinación cromatográfica de las distintas sustancias que componen la mezcla comercial de LAS, que como ya se ha mencionado, es una mezcla de homólogos e isómeros, diferenciándose en el tamaño de la cadena hidrófoba y en la posición del anillo bencénico respectivamente. Por tanto, su determinación se ha enfocado desde tres perspectivas diferentes: cuantificación del contenido total de LAS (donde todos sus componentes se solapan en un único pico cromatográfico), separación y cuantificación de las cuatro familias de homólogos (C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>), y separación y cuantificación de los diferentes isómeros posicionales que conforman cada familia de homólogos. Posteriormente, se aborda la aplicación de la metodología desarrollada en las matrices estudiadas.

## **2 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS EN EL PROCESO CROMATOGRÁFICO**

A continuación se comenta las variables optimizadas en la separación cromatográfica.

### **2.1 - Selección de la fase estacionaria**

Con objeto de optimizar la separación cromatográfica del LAS, se han estudiado

distintos tipos de fases estacionarias. Atendiendo a la diferente polaridad relativa existente entre fase móvil y fase estacionaria, se pueden distinguir dos tipos de cromatografía líquida: cromatografía en *fase normal* (fase estacionaria más polar que la fase móvil) y cromatografía en *fase inversa*, donde la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. A continuación se comenta cada una de ellas.

Los rellenos más comúnmente utilizados en **fase normal** son: *sílice* y *alúmina*, siendo que en la primera pueden ser enlazadas grupos funcionales polares como: *ciano*, *diol*, y *amino*. Normalmente, la fase amino (-NH<sub>2</sub>) proporciona un buen nivel de selectividad y una gran versatilidad dado que ofrece la posibilidad de utilizarla en fase normal, como intercambiadora aniónica débil (usando pH ácidos en la fase móvil) e incluso en fase inversa, aunque adolece de buena estabilidad química si se compara con rellenos de similares características mucho más estables aunque menos versátiles, como es el relleno compuesto de grupos ciano (-CN) enlazados al soporte de sílice. De todas ellas se ensayó la fase -NH<sub>2</sub>, en las tres modalidades indicadas:

- Fase normal: utilizando como fase móvil una mezcla compuesta de isopropanol y diclorometano.
- Intercambiadora aniónica débil: usando en la fase móvil un medio ácido que protone los grupos amino de la fase estacionaria.
- Fase inversa: utilizando como fase móvil acetonitrilo/agua.

Los resultados obtenidos con esta fase estacionaria no fueron satisfactorios en ninguno de los casos.

La bibliografía recoge abundantes metodologías para la determinación de LAS usando cromatografía líquida en su **modalidad inversa**. El relleno más comúnmente utilizado es sílice enlazada a cadenas alquílicas de distinta longitud que ofrecen distintos grados de polaridad. Las partículas de este relleno se presentan con diferentes morfologías: partículas amorfas (ej: LiChrosorb - Merck), o con partículas con esferas simétricas (ej: LiChrospher - Merck; Zorbax - Agilent Technologies, Symmetry - Waters; Luna - Phenomenex). Las partículas con morfología de esferas simétricas proporcionan un empaquetamiento uniforme con una elevada resistencia física y química, además se favorece la reacción de enlace entre la base sílicea y la fase enlazada (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>,...), mejorando así la eficiencia de la columna.

El poder de resolución de este tipo de rellenos radica en las interacciones hidrofóbicas existentes entre las cadenas hidrocarbonadas que conforman la fase enlazada y la parte apolar de las moléculas de analito. De este modo, cuanto mayor sea la longitud de la cadena alquílica de la fase estacionaria, mayor será la interacción entre ésta y el analito, mayor será también el número de equilibrios establecidos o platos teóricos (N) y mayor por tanto el poder de resolución. Así se puede saber, a priori, que el mayor poder resolutivo vendrá dado por rellenos donde la base sílicea ha sido enlazada a cadenas alquílicas largas, normalmente cadenas de 18 carbonos (C<sub>18</sub>), y que rellenos con cadenas alquílicas de menor número de carbonos presentarán un poder resolutivo también menor.

Además, a medida que aumenta la longitud de la columna cromatográfica, aumentará del mismo modo el poder resolutivo, ya que el número de platos teóricos será mayor también.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se comentan a continuación

las columnas ensayadas, en primer lugar para la resolución de homólogos y, a continuación, de isómeros:

- Lichrospher C<sub>8</sub> 125x4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Merck).
- Zorbax Eclipse - XDB C<sub>8</sub> 150x4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).

La diferencia fundamental entre ambos rellenos constituidos por partículas con esferas simétricas, radica en el doble proceso de pasivación de los posibles grupos silanoles que no hayan reaccionado una vez funcionalizada la sílice. Este proceso de pasivado recibe el nombre de “*endcapping*” XDB (*Extra Densely Bonded*) y hace que desaparezcan las interacciones entre la parte polar del analito y estos grupos silanoles polares. Abajo se recogen dos cromatogramas correspondientes a una disolución de LAS de 20 mg·L<sup>-1</sup> empleando estas dos columnas: Lichrospher C<sub>8</sub> y Zorbax C<sub>8</sub>.

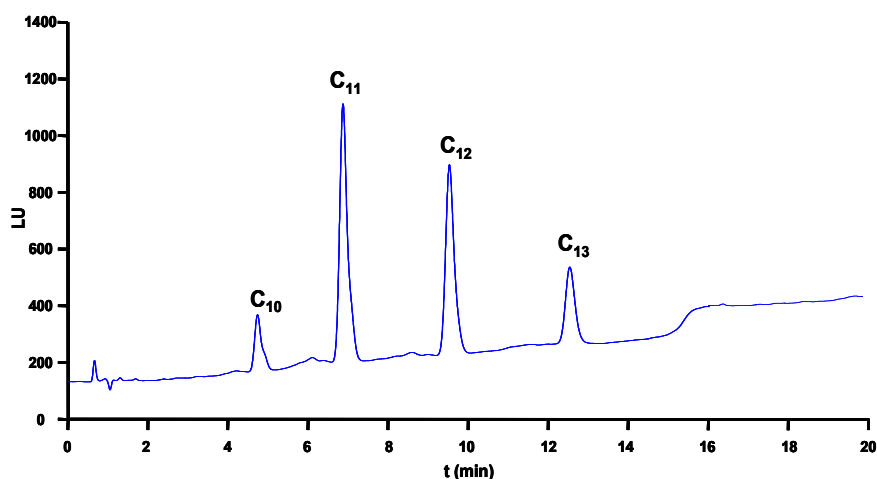


Figura 3.1 - Lichrospher C<sub>8</sub> (125x4.6 mm)

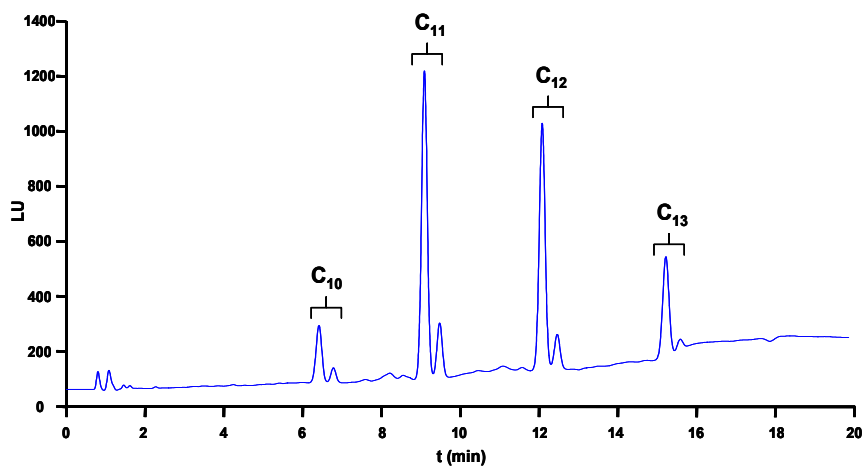


Figura 3.2 - Zorbax XDB C<sub>8</sub> (125x4.6 mm)

Para estos ensayos las condiciones cromatográficas ensayadas fueron:

Tabla 3.1 - Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Inyección	100 $\mu$ L
Flujo	1.0 mL $\cdot$ min <sup>-1</sup>
Temperatura	40°C
Fase Móvil	<b>A:</b> MetOH / <b>B:</b> SDS 30 mM <b>A:</b> 55% - 70% (0 - 16 min)
Detección	$\lambda_{exc}$ : 230 nm / $\lambda_{em}$ : 290 nm
Ganancia	13

Según se observa, el poder de resolución de la columna Zorbax es mayor que el obtenido con Lichrospher, ya que en las mismas condiciones de trabajo la columna Zorbax es capaz de resolver los isómeros 2 fenilo de cada homólogo, mientras que la primera columna engloba a todos los

isómeros de un mismo homólogo en un sólo pico. A la vista de los resultados, se selecciona como fase estacionaria, la columna **LiChrospher C<sub>8</sub> 125x4.6 mm** para la separación y cuantificación de los cuatro homólogos que constituyen la mezcla comercial de LAS.

Para abordar la resolución de los diferentes isómeros del LAS se debe utilizar aquella columna que ofrezca una capacidad de resolución máxima. Esto es, columnas de una longitud elevada y con rellenos de naturaleza altamente hidrofóbica (relleno C<sub>18</sub>).

Las columnas ensayadas en este caso fueron:

- LiChrospher C<sub>18</sub> 250x4.6 mm (Merck), con un poder resolutivo elevado ya que presenta la cadena alquílica con los grupos funcionales más larga.
- “Chromolith” C<sub>18</sub> 100x4.6 mm, columna monolítica que, aún siendo de menor longitud que la columna “LiChrospher” (250 mm), su poder resolutivo es comparable; además ofrece otras ventajas como son: posibilidad de efectuar gradientes de flujo, disminución del tiempo de análisis y disminución drástica de la presión de trabajo.

El relleno de este tipo de columna se ha desarrollado en base a un nuevo proceso *sol-gel* para la preparación de barras monolíticas de sílice porosa que utiliza alcoxisilanos libres de metales y de elevada pureza. La barra de sílice posee una estructura rígida biporosa consistente en macroporos y mesoporos en su esqueleto y que proporcionan una elevada porosidad comparada con las columnas de relleno de partículas. De este modo se

consigue que este tipo de columnas puedan operar a velocidades de flujo altas sin que exista disminución de resolución ni las limitaciones propias debidas a la retropresión del sistema.

Se realizó un estudio comparando los diferentes parámetros cromatográficos obtenidos al utilizar una fase estacionaria particulada (LiChrospher RP<sub>18</sub> 250x4.6mm con 5 µm de tamaño de poro) y una columna de tipo monolítica (Chromolith RP<sub>18</sub> 100x4.6 mm). Los datos mostrados se han calculado para el primer pico aparecido en el cromatograma y que corresponde al isómero 5 fenil del homólogo C<sub>10</sub> y para el último en salir, atribuido al isómero 2 fenil del homólogo C<sub>13</sub>. En la **Tabla 3.2**, se recoge los datos obtenidos.

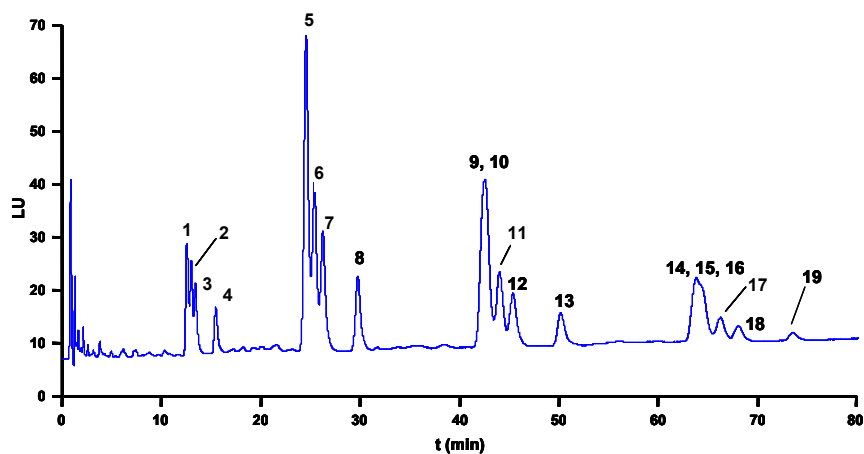
**Tabla 3.2** - Parámetros cromatográficos para diferentes isómeros del LAS utilizando fase estacionaria monolítica y de partículas

	Chromolith (RP <sub>18</sub> 100x4.6 mm)		LiChrospher (RP <sub>18</sub> 5 µm 250x4.6 mm)	
	5ØC <sub>10</sub>	2ØC <sub>13</sub>	5ØC <sub>10</sub>	2ØC <sub>13</sub>
<b>t<sub>r</sub> (min)</b>	12.3	77.4	33.3	123.1
<b>K'</b>	9.53	65.08	26.25	99.65
<b>W<sub>0.5h</sub> (min)</b>	0.27	0.94	0.52	0.87
<b>R<sub>s</sub>*</b>	0.80	3.81	1.04	4.59
<b>N</b>	11858	37287	22892	110602
<b>α *</b>	1.03	1.08	1.03	1.06

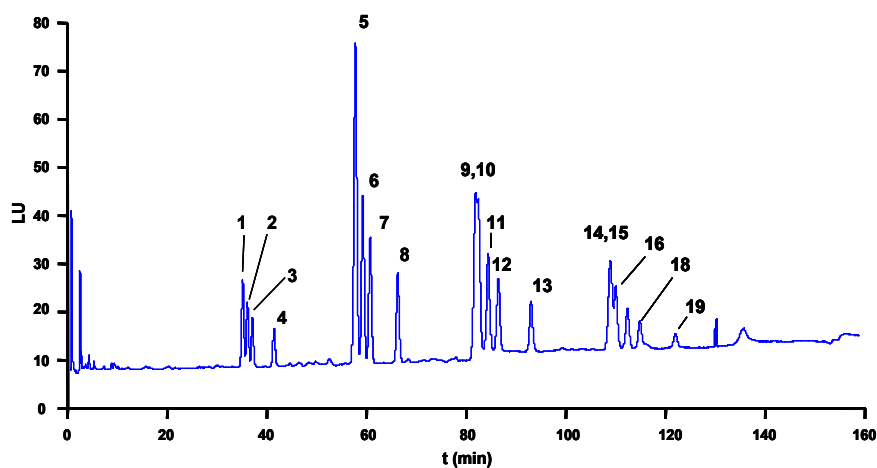
\* Para el cálculo de este parámetro se ha considerado junto con el pico en estudio, el pico adyacente

Las **Figuras 3.3** y **3.4**, ilustran los resultados obtenidos para las dos columnas ensayadas y en la **Tabla 2.3** las condiciones cromatográficas

establecidas para estos ensayos.



**Figura 3.3** - Resolución de isómeros utilizando una columna monolítica. Los picos se identifican como: (1)  $5\text{OC}_{10}$ ; (2)  $4\text{OC}_{10}$ ; (3)  $3\text{OC}_{10}$ ; (4)  $2\text{OC}_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{OC}_{11}$ ; (6)  $4\text{OC}_{11}$ ; (7)  $3\text{OC}_{11}$ ; (8)  $2\text{OC}_{11}$ ; (9)  $6\text{OC}_{12}$ ; (10)  $5\text{OC}_{12}$ ; (11)  $4\text{OC}_{12}$ ; (12)  $3\text{OC}_{12}$ ; (13)  $2\text{OC}_{12}$ ; (14)  $7\text{OC}_{13}$ ; (15)  $6\text{OC}_{13}$ ; (16)  $5\text{OC}_{13}$ ; (17)  $4\text{OC}_{13}$ ; (18)  $3\text{OC}_{13}$ ; (19)  $2\text{OC}_{13}$



**Figura 3.4** - Resolución de isómeros utilizando una de relleno particulado Lichrospher. Los picos se identifican como: (1)  $5\text{OC}_{10}$ ; (2)  $4\text{OC}_{10}$ ; (3)  $3\text{OC}_{10}$ ; (4)  $2\text{OC}_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{OC}_{11}$ ; (6)  $4\text{OC}_{11}$ ; (7)  $3\text{OC}_{11}$ ; (8)  $2\text{OC}_{11}$ ; (9)  $6\text{OC}_{12}$ ; (10)  $5\text{OC}_{12}$ ; (11)  $4\text{OC}_{12}$ ; (12)  $3\text{OC}_{12}$ ; (13)  $2\text{OC}_{12}$ ; (14)  $7\text{OC}_{13}$ ; (15)  $6\text{OC}_{13}$ ; (16)  $5\text{OC}_{13}$ ; (17)  $4\text{OC}_{13}$ ; (18)  $3\text{OC}_{13}$ ; (19)  $2\text{OC}_{13}$



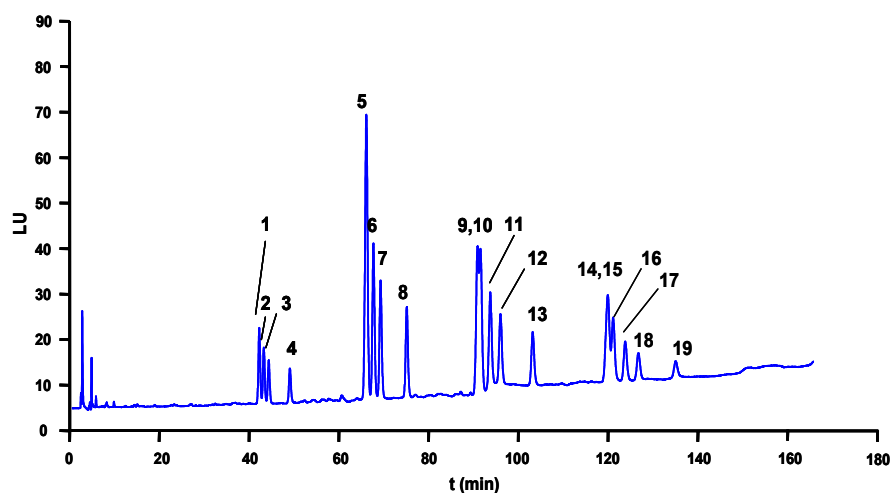
**Tabla 3.3 - Condiciones cromatográficas**

<b>Condiciones cromatográficas</b>	
<b>Inyección</b>	100 $\mu$ L
<b>Flujo</b>	1.0 - 0.25 mL $\cdot$ min <sup>-1</sup> (0 - 160 min)
<b>Temperatura</b>	40°C
<b>Fase Móvil</b>	<b>A:</b> ACN / <b>B:</b> SDS 5 mM <b>A:</b> 20% - 50 % (0 - 160 min)
<b>Detección</b>	$\lambda_{exc}$ : 230 nm / $\lambda_{em}$ : 290 nm
<b>Ganancia</b>	12

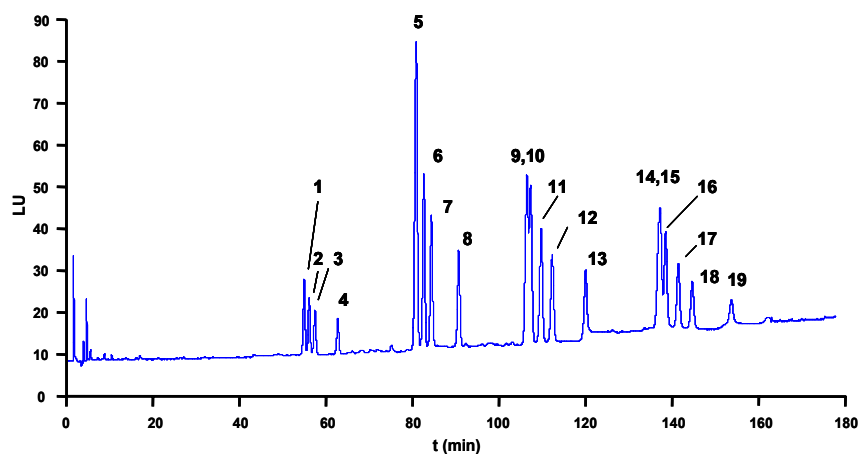
En estas condiciones se puede observar que, aunque el tiempo de análisis se reduce drásticamente utilizando la columna monolítica, la máxima resolución se obtiene cuando se emplea la columna **LiChrospher C<sub>18</sub> 250x4.6 mm**, siendo por tanto la seleccionada para la resolución de isómeros posicionales de LAS.

A pesar de las mejoras observadas en la resolución de isómeros con la columna seleccionada, los valores obtenidos no permiten la cuantificación de todos los isómeros. Por lo que se optó por un acoplamiento de columnas con objeto de mejorar la resolución. Los acoplamientos ensayados fueron entre columnas C<sub>18</sub> LiChrospher (250x4.6 mm) + monolítica (100x4.6 mm) y Lichrospher (250x4.6 mm) + Lichrospher (250x4.6 mm).

Los cromatogramas obtenidos referentes a estos ensayos se muestran en las **Figuras 3.5** y **3.6**.



**Figura 3.5** - Cromatograma correspondiente al acoplamiento Lichrospher  $C_{18}$  (250x4.6 mm) + monolítica (100x4.6 mm). Los picos se identifican como: (1)  $5\text{Ø}C_{10}$ ; (2)  $4\text{Ø}C_{10}$ ; (3)  $3\text{Ø}C_{10}$ ; (4)  $2\text{Ø}C_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{Ø}C_{11}$ ; (6)  $4\text{Ø}C_{11}$ ; (7)  $3\text{Ø}C_{11}$ ; (8)  $2\text{Ø}C_{11}$ ; (9)  $6\text{Ø}C_{12}$ ; (10)  $5\text{Ø}C_{12}$ ; (11)  $4\text{Ø}C_{12}$ ; (12)  $3\text{Ø}C_{12}$ ; (13)  $2\text{Ø}C_{12}$ ; (14)  $7\text{Ø}C_{13}$ ; (15)  $6\text{Ø}C_{13}$ ; (16)  $5\text{Ø}C_{13}$ ; (17)  $4\text{Ø}C_{13}$ ; (18)  $3\text{Ø}C_{13}$ ; (19)  $2\text{Ø}C_{13}$



**Figura 3.6** - Cromatograma correspondiente al acoplamiento Lichrospher  $C_{18}$  (250x4.6 mm) + Lichrospher  $C_{18}$  (250x4.6 mm). Los picos se identifican como: (1)  $5\text{Ø}C_{10}$ ; (2)  $4\text{Ø}C_{10}$ ; (3)  $3\text{Ø}C_{10}$ ; (4)  $2\text{Ø}C_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{Ø}C_{11}$ ; (6)  $4\text{Ø}C_{11}$ ; (7)  $3\text{Ø}C_{11}$ ; (8)  $2\text{Ø}C_{11}$ ; (9)  $6\text{Ø}C_{12}$ ; (10)  $5\text{Ø}C_{12}$ ; (11)  $4\text{Ø}C_{12}$ ; (12)  $3\text{Ø}C_{12}$ ; (13)  $2\text{Ø}C_{12}$ ; (14)  $7\text{Ø}C_{13}$ ; (15)  $6\text{Ø}C_{13}$ ; (16)  $5\text{Ø}C_{13}$ ; (17)  $4\text{Ø}C_{13}$ ; (18)  $3\text{Ø}C_{13}$ ; (19)  $2\text{Ø}C_{13}$

De los resultados alcanzados, se desprende que la mayor resolución se consigue acoplando dos columnas Lichrospher C<sub>18</sub> de 250x4.6 mm de longitud. Según se observa, se mejora sensiblemente la resolución obteniéndose en todos los casos un valor próximo a 1.5 cuando se conectan en serie dos columnas Lichrospher C<sub>18</sub> de 250 mm. Sin embargo se mantienen dos grupos de isómeros, el 5Ø y 6Ø del homólogo C<sub>12</sub> y el 5Ø, 6Ø y 7Ø del homólogo C<sub>13</sub> donde la resolución obtenida no permite una adecuada cuantificación de manera individual. En la **Tabla 3.4**, se recoge las condiciones cromatográficas para esta finalidad.

**Tabla 3.4 - Condiciones cromatográficas**

Condiciones cromatográficas	
<b>Inyección</b>	100 µL
<b>Flujo</b>	1.0 - 0.25 mL·min <sup>-1</sup> (0 - 160 min)
<b>Temperatura</b>	40°C
<b>Fase Móvil</b>	<b>A:</b> ACN / <b>B:</b> SDS 5 mM <b>A:</b> 20% - 50 % (0 - 160 min)
<b>Detección</b>	λ <sub>exc</sub> : 230 nm / λ <sub>em</sub> : 308 nm
<b>Ganancia</b>	12

## 2.2 - Estudio de la composición de la fase móvil

Fue necesario estudiar la influencia de las siguientes condiciones para proporcionar un mejor desempeño en la separación cromatográfica.

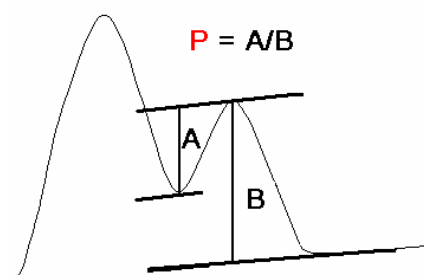
### 2.2.1 - Estudio del comportamiento de diferentes disolventes orgánicos sobre la resolución de LAS

Con este estudio se pretende seleccionar el disolvente orgánico adecuado

para conseguir la mejor resolución de los distintos homólogos o isómeros del LAS, según los requerimientos del análisis.

Para ello se han seleccionado, de entre los distintos disolventes orgánicos de uso frecuente en cromatografía líquida, aquellos más empleados para el análisis de LAS: metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano (THF).

En primer lugar y debido al solapamiento entre picos, se definió un *parámetro de resolución (P)* como:



*Figura 3.7 - Parámetro de resolución P*

$P$  se define como la relación existente entre la distancia definida por la parte superior del pico de menor altura y la parte inferior del valle ( $A$ ), y la altura del pico más pequeño ( $B$ ). Este parámetro tendrá un valor máximo de 1 cuando los picos que se consideran se encuentren totalmente separados (o resueltos), y un valor próximo a 0 cuando se encuentren muy solapados.

El establecimiento de este parámetro se debió al mayor error que representa el uso de la expresión convencional de resolución cuando existe un alto grado de solapamiento entre los picos en estudio.

Para la selección de los disolventes se recurrió al modelo isoelutrópico<sup>1</sup>. Este modelo se basa en la comparación del parámetro de resolución ( $P$ ) para picos cuyo tiempo de retención debe ser del mismo orden al usar diferentes disolventes orgánicos o mezcla de ellos. Para conseguir que los picos cromatográficos aparezcan a tiempos de retención similares cuando cambiamos de disolvente orgánico en la fase móvil, hemos de considerar la fuerza elutrópica de cada uno de ellos. El valor asignado para los distintos disolventes puros empleados es: 4.4 para THF, 3.1 para acetonitrilo y 2.6 para metanol. Para cuantificar el poder elutrópico de las mezclas de los distintos disolventes utilizados se emplea la ecuación:

$$E = (A \cdot f) + [B \cdot (1-f)] \quad (3.1)$$

donde  $E$  es el poder elutrópico de la mezcla,  $A$  y  $B$  son los poderes elutrópicos de los disolventes puros que componen la mezcla y  $f$  es la fracción de cada componente. No obstante, para el caso del LAS los valores teóricos estimados no se ajustaban perfectamente a los valores experimentales, por tanto fue necesario determinarlos de manera experimental por comparación de los cromatogramas obtenidos en cada caso.

Si se obtenían los cromatogramas empleando como fase móvil únicamente las mezclas de disolvente establecidas mediante el modelo isoelutrópico, los resultados no permitían extraer conclusiones ya que no se observaba resolución alguna, por tanto fue necesario recurrir al empleo de alguno de los modificadores utilizados tradicionalmente: ácido acético/trietilamina o perclorato sódico.

---

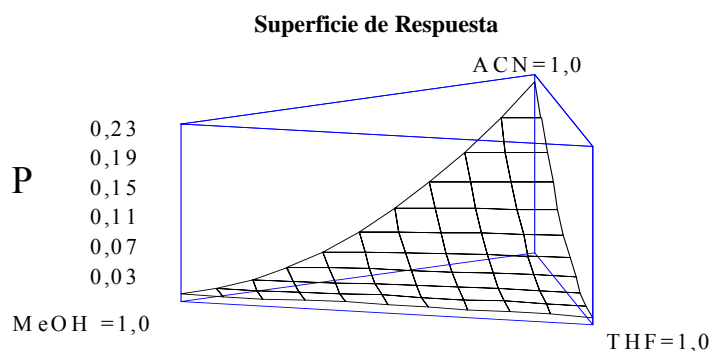
<sup>1</sup> Nyireddy S., Meier B., Erdelmeier C.A.J., Sticher O., "PRISMA": A geometrical design for solvent optimization in HPLC. J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Communic. 8; 186-188, 1985

Experimentalmente se ha constatado que el uso de agentes formadores de pares iónicos en la fase móvil (ácido acético - trietilamina) hace que el tiempo de retención varíe considerablemente al variar el pH. En nuestro caso, al ser necesario utilizar un gradiente de disolvente orgánico en la fase móvil para así obtener separaciones satisfactorias; se producen también variaciones en la concentración de protones del medio. Por tanto el uso de este tipo de aditivos hace que en el diseño experimental se introduzcan dos variables para una sola respuesta, ya que el cambio en el tiempo de retención puede ser atribuible tanto al cambio de fortaleza de la fase móvil debida al poder elutrópico del medio, como al cambio de pH que implica el propio gradiente. Esta situación debe evitarse para poder analizar satisfactoriamente los resultados que se obtienen ya que para la realización de este estudio las condiciones de trabajo han de fijarse de manera que la única variable sea el cambio de disolvente.

Para ello se optó por utilizar  $\text{NaClO}_4$  como aditivo de la fase móvil, de esta forma el fenómeno predominante en el proceso de separación es el “*salting out*”, que en nuestro caso no se ve afectado por el pH del medio.

Una vez que los diferentes picos del cromatograma presentaban un tiempo de retención similar, al variar la proporción de disolvente orgánico según su poder elutrópico, se pudo comparar el grado de resolución obtenido con el uso de cada uno de ellos.

La representación de los resultados obtenidos puede ser observada en la **Figura 3.8**.



**Figura 3.8** - Superficie de respuesta obtenida a partir del modelo isoelutrópico

Como se observa en la figura el grado de resolución mayor se obtiene cuando la fase móvil está formada por acetonitrilo/agua; siendo más pobre la resolución obtenida cuando se usa como disolvente orgánico tanto metanol como THF. En función del grado de resolución deseado, se seleccionó el disolvente más adecuado.

- Para la resolución de homólogos, la elección más adecuada es metanol o tetrahidrofurano, ya que estos disolventes ofrecen un menor poder resolutivo. Sin embargo el uso de tetrahidrofurano tiene el inconveniente de ir acompañado, normalmente, de pequeñas cantidades de peróxidos como impurezas que se generan por su descomposición química, pudiendo dañar el sistema cromatográfico al ser corrosivo del acero inoxidable. Por tanto, el metanol será el disolvente orgánico propuesto para esta determinación.

- Para la resolución de isómeros del LAS, la elección más adecuada es acetonitrilo, ya que este disolvente ofrece el mayor poder resolutivo.

### 2.2.2 - Estudio del comportamiento de diferentes modificadores de la fase móvil

Las sustancias estudiadas como aditivos de la fase móvil con objeto de

mejorar la separación cromatográfica del LAS se pueden agrupar, atendiendo a su naturaleza, en:

- ⇒ Formadores de pares iónicos: trietilamina - ácido acético, acetato amónico.
- ⇒ Sales inorgánicas: perclorato sódico ( $\text{NaClO}_4$ )
- ⇒ Surfactantes: Aniónico (dodecilsulfato sódico - SDS); catiónicos (bromuro de cetilpiridinio - BrCP - y bromuro de hexadecil trimetil amonio - BrHTA); no iónico (Tritón X-100)

De este modo, para proceder a la evaluación de la influencia de todas estas sustancias, se las sometieron y ensayaron bajo las mismas condiciones de separación cromatográfica. Así que para esta finalidad, las condiciones instrumentales seleccionadas y utilizadas fueron las descritas en la **Tabla 3.5**.

**Tabla 3.5 - Parámetros instrumentales utilizados en el estudio**

Condiciones de separación cromatográfica	
<b>Columna</b>	LiChrospher C <sub>18</sub> 250x4.6 mm (5 μm)
<b>Inyección</b>	10 μL
<b>Flujo</b>	1 mL·min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura</b>	40°C
<b>Fase Móvil</b>	<b>A:</b> ACN / <b>B:</b> disolución acuosa de varios aditivos <b>A:</b> 20% - 40 % (0 - 160 min)
<b>Detección</b>	$\lambda_{\text{exc}}$ : 230 nm / $\lambda_{\text{em}}$ : 308 nm
<b>Ganancia</b>	12



En la **Tabla 3.6** se recogen las concentraciones ensayadas para cada uno de los aditivos. Para los diferentes surfactantes se tomó como referencia la concentración micelar crítica (CMC) de cada uno de ellos<sup>2</sup>.

**Tabla 3.6** - Concentraciones de aditivos utilizadas en la fase móvil

Aditivo	Concentración
Trietilamina/ácido acético	5 mM / 5 mM
Acetato amónico	10 mM
NaClO <sub>4</sub>	50 mM
SDS	8 mM
BrCP	0.9 mM
BrHTA	0.92 mM
Tritón X-100	0.24 mM
β-ciclodextrina	1.00 mM

El uso de formadores de pares iónicos (ácido acético-trietilamina, acetato acético) presenta el inconveniente de ver afectado su comportamiento por cambios en el pH de la fase móvil, como ya se ha comentado, aspecto éste difícil de considerar cuando se trabaja en gradiente en la fase móvil. El empleo de sales inorgánicas presenta el inconveniente de necesitar especial cuidado en la limpieza del sistema cromatográfico, debido a que se pueden producir precipitaciones en el interior de los capilares y de la columna que provocarían una sobrepresión en el sistema, además del posible daño que se pueda provocar en los pistones de la bomba. Además,

<sup>2</sup> Fernández A., *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*, S. G. Schulman; Ed. Univ. de Granada, España, 2001

la resolución obtenida es sensiblemente menor que con el uso de dodecil sulfato sódico. Esto se puede observar en la **Tabla 3.7**. Para este ensayo las condiciones de separación cromatográficas estipuladas fueron con el empleo de una columna LiChrospher RP<sub>18</sub> (125x4.6 mm) usando un gradiente de composición de 30% a 70% de acetonitrilo en un tiempo de 35 minutos.

**Tabla 3.7** - Comparación entre resoluciones obtenidas empleando SDS o NaClO<sub>4</sub> como aditivo de la fase móvil

	R <sub>s</sub> (4Ø-3ØC <sub>12</sub> )	R <sub>s</sub> (5+6Ø - 4ØC <sub>12</sub> )
SDS	0.91	0.84
NaClO <sub>4</sub>	0.86	0.76

Por otra parte, los surfactantes catiónicos ensayados forman un par iónico con el LAS, de naturaleza muy hidrofóbica debido a que al unirse mediante atracciones electrostáticas las partes polares, dejan expuestos solamente los extremos lipofílicos. Estas entidades hidrofóbicas impiden la adecuada elución de los analitos.

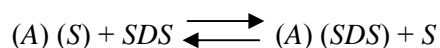
Algo similar ocurre cuando se emplea β-ciclodextrina como modificador de la fase móvil. El complejo de inclusión altamente hidrofóbico impide su elución de la columna.

Cabe destacar asimismo que la fluorescencia nativa que posee el surfactante no iónico Tritón X-100 provoca un elevado nivel de ruido que impide la adecuada integración y posterior cuantificación de los diferentes analitos.

De este estudio se desprende que el compuesto que ofrece un mejor comportamiento en la separación cromatográfica del LAS es el dodecil sulfato sódico, ya que produce una buena resolución, buen comportamiento de la línea base, y presenta una gran versatilidad debido a su diferente comportamiento a altas y bajas concentraciones.

### 2.2.3 - Estudio del comportamiento del SDS en la fase móvil

Según se recoge en bibliografía<sup>3</sup>, este surfactante no forma micelas en la fase móvil si la proporción de disolvente orgánico es superior al 20%; esto es debido a que las interacciones entre los monómeros de surfactante (*SDS*) y moléculas de disolvente orgánico son preferidas a las interacciones mutuas entre moléculas de surfactante. Sin embargo, si se producen interacciones entre *SDS* y moléculas de analito y recibe el nombre de *asociación solvofóbica*. La separación se basa en la formación de complejos de asociación de diferente fortaleza, dependiendo de la diferente hidrofobicidad de los analitos, de acuerdo con el siguiente equilibrio:

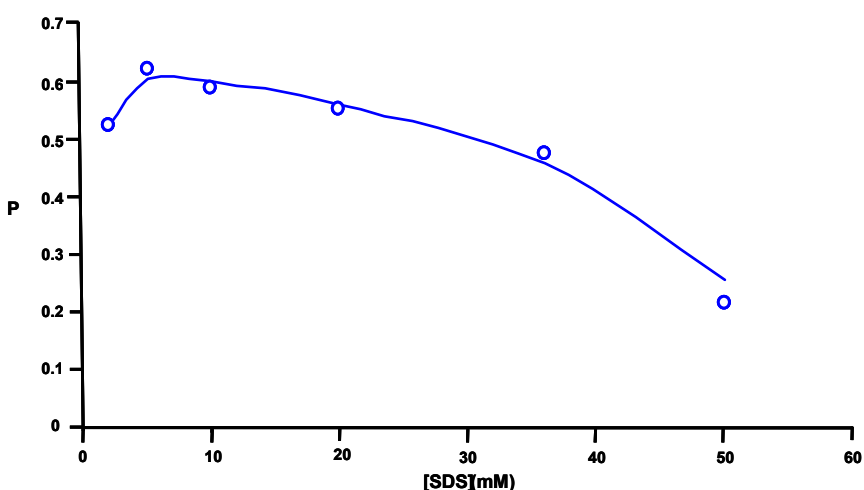


Donde *A* es el analito, *S* es el disolvente. Para analitos con carga negativa, como es el caso del LAS, esta interacción es posible ya que se produce por asociación de la parte apolar de cada molécula. La diferente hidrofobicidad de cada homólogo de la mezcla de LAS en función de la longitud de la cadena alquílica, y de cada isómero en función de la posición del anillo aromático en la cadena de carbonos, hace que el

<sup>3</sup> Heinig K., Vogt C., Werner G., Analyst, *Determination of LAS in industrial and environmental samples by CE*; Analyst 123; 349-353, 1998

grado de asociación con el *SDS* sea diferente y por tanto que la movilidad en el interior de la columna sea distinta.

Una vez seleccionado el dodecil sulfato sódico (*SDS*) como modificador de la fase móvil, se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de los diferentes componentes de la mezcla comercial de *LAS* a distintas concentraciones de modificador y en las mismas condiciones cromatográficas descritas en el apartado anterior. Para evaluar dicho efecto se consideró el parámetro de resolución *P* entre los isómeros 3 y 4 fenil del homólogo  $C_{11}$ . De este estudio se desprenden los resultados recogidos en la **Figura 3.9**.



**Figura 3.9** - Variación del parámetro de resolución (*P*) con la concentración de *SDS* en la fase móvil

Se observa que existe un máximo de resolución a concentraciones próximas a 5 mM, y esta resolución decrece a medida que nos apartamos de este valor. Teniendo en cuenta esto, se puede establecer que la concentración óptima para la resolución de isómeros es 5 mM.

Para la resolución de homólogos se ha optado por utilizar concentraciones altas de *SDS* asegurando así resultados reproducibles; estableciéndose una concentración de 30 mM.

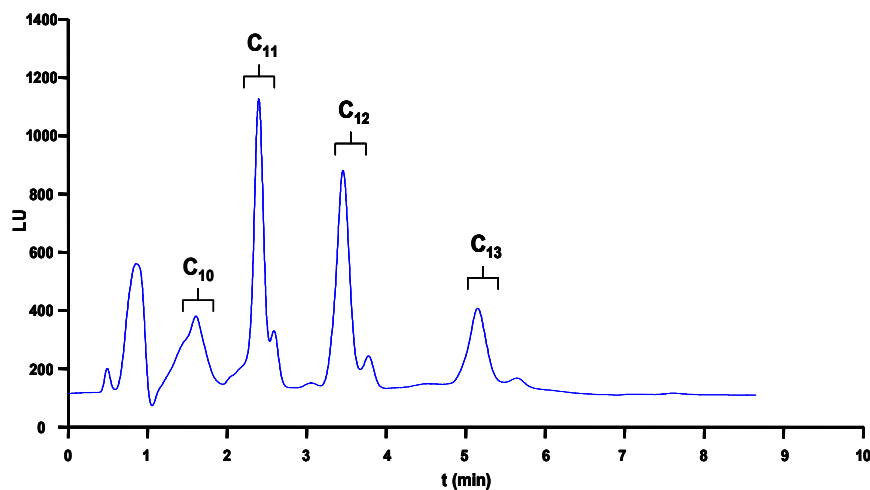
#### **2.2.4 - Estudio del pH de la fase móvil**

Otro aspecto a tener en cuenta es el pH de la fase móvil. La tolerancia de columnas en fase reversa en general recomienda no trabajar a un valor de pH mayor de 8 ó por debajo de 2.5 aproximadamente. Del estudio de la influencia del pH se desprende que en este rango de trabajo esta variable no afecta significativamente en el proceso de separación, tanto los tiempos de retención como la resolución y el área de pico no sufren cambios significativos. Esto puede ser debido al carácter fuertemente ácido del sulfonato de alquilbenceno, hecho que impide la protonación del grupo sulfonato en el rango de pH de trabajo y, por tanto, de cambios en la retención del compuesto sobre la fase estacionaria.

#### **2.2.5 - Optimización del gradiente de composición de la fase móvil**

Existen dos modalidades diferentes para llevar a cabo un análisis cromatográfico, manteniendo constante la composición de la fase móvil, esto es en modo *isocrático*, y variando de manera lineal la composición de la fase móvil, o en modo *gradiente*.

En las siguientes figuras se puede ver cromatogramas en modo isocrático tanto para homólogos (*Figura 3.10*) como para isómeros (*Figura 3.11*).

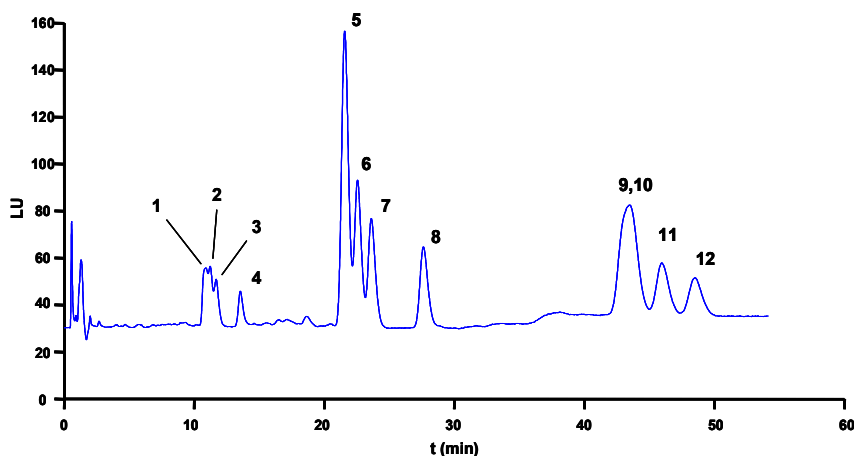


**Figura 3.10** - Resolución de homólogos de LAS en modo isocrático (40:60 ACN/SDS 5 mM)

Para la obtención de esta separación cromatográfica, las condiciones empleadas fueron las presentes en la **Tabla 3.8**.

**Tabla 3.8** - Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Columna	LiChrospher RP <sub>8</sub> 125x4.6 mm (5 μm)
Inyección	10 μL
Flujo	1.0 mL·min <sup>-1</sup>
Temperatura	40°C
Fase Móvil	<b>A</b> : ACN (40%) / <b>B</b> : SDS 5 mM (60%)
Detección	λ <sub>exc.</sub> : 230 nm / λ <sub>em.</sub> : 290 nm
Ganancia	16



**Figura 3.11** - Resolución de isómeros de LAS en modo isocrático (30:70 ACN:SDS 5mM) Los picos se identifican como: (1) 5 $\text{OC}_{10}$ ; (2) 4 $\text{OC}_{10}$ ; (3) 3 $\text{OC}_{10}$ ; (4) 2 $\text{OC}_{10}$ ; (5) 5 y 6 $\text{OC}_{11}$ ; (6) 4 $\text{OC}_{11}$ ; (7) 3 $\text{OC}_{11}$ ; (8) 2 $\text{OC}_{11}$ ; (9) 6 $\text{OC}_{12}$ ; (10) 5 $\text{OC}_{12}$ ; (11) 4 $\text{OC}_{12}$ ; (12) 3 $\text{OC}_{12}$

Para la obtención de esta separación cromatográfica, las condiciones empleadas fueron las presentes en la **Tabla 3.9**.

**Tabla 3.9** - Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Columna	LiChrospher RP <sub>18</sub> 250x4.6 mm (5 $\mu\text{m}$ )
Inyección	100 $\mu\text{L}$
Flujo	1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$
Temperatura	40°C
Fase Móvil	<b>A:</b> ACN (30%) / <b>B:</b> SDS 5 mM (70%)
Detección	$\lambda_{\text{exc}}$ : 230 nm / $\lambda_{\text{em}}$ : 290 nm
Ganancia	12

Para el caso de los homólogos de LAS, los ensayos en modo isocrático no fueron satisfactorios, ya que empezaba a resolverse el isómero 2Ø correspondiente a cada homólogo, repercutiendo así en la simetría y dificultando su adecuada integración.

Según se observa en el cromatograma de separación de isómeros, la resolución de sus componentes tampoco es posible trabajando en modo isocrático debido a la complejidad de la mezcla.

Para abordar el problema se empezó con la resolución de homólogos plateando para ello diferentes gradientes lineales cubriendo en principio un amplio rango de fuerza elutropica con un barrido en el porcentaje de metanol desde 30% hasta 70% en un tiempo de 15 minutos, y se fue acotando este rango hasta obtener una buena separación y tiempos de análisis relativamente cortos. Como resultado de este ensayo, se eligió el gradiente partiendo de una proporción de metanol de 55% llegando a 70%, consumiendo un tiempo de 15 minutos. Este cromatograma puede ser observado en la **Figura 3.1**.

Para la separación cromatográfica de isómeros del LAS, se ensayaron diferentes gradientes lineales en los que el porcentaje de acetonitrilo variaba de 20% a 50%, disminuyendo gradualmente la pendiente de dicho gradiente según se indica en la **Tabla 3.10**. En esta tabla, también se presenta las demás condiciones cromatográficas empleadas para esta finalidad. Los resultados obtenidos pueden ser observados en la **Figura 3.12**.



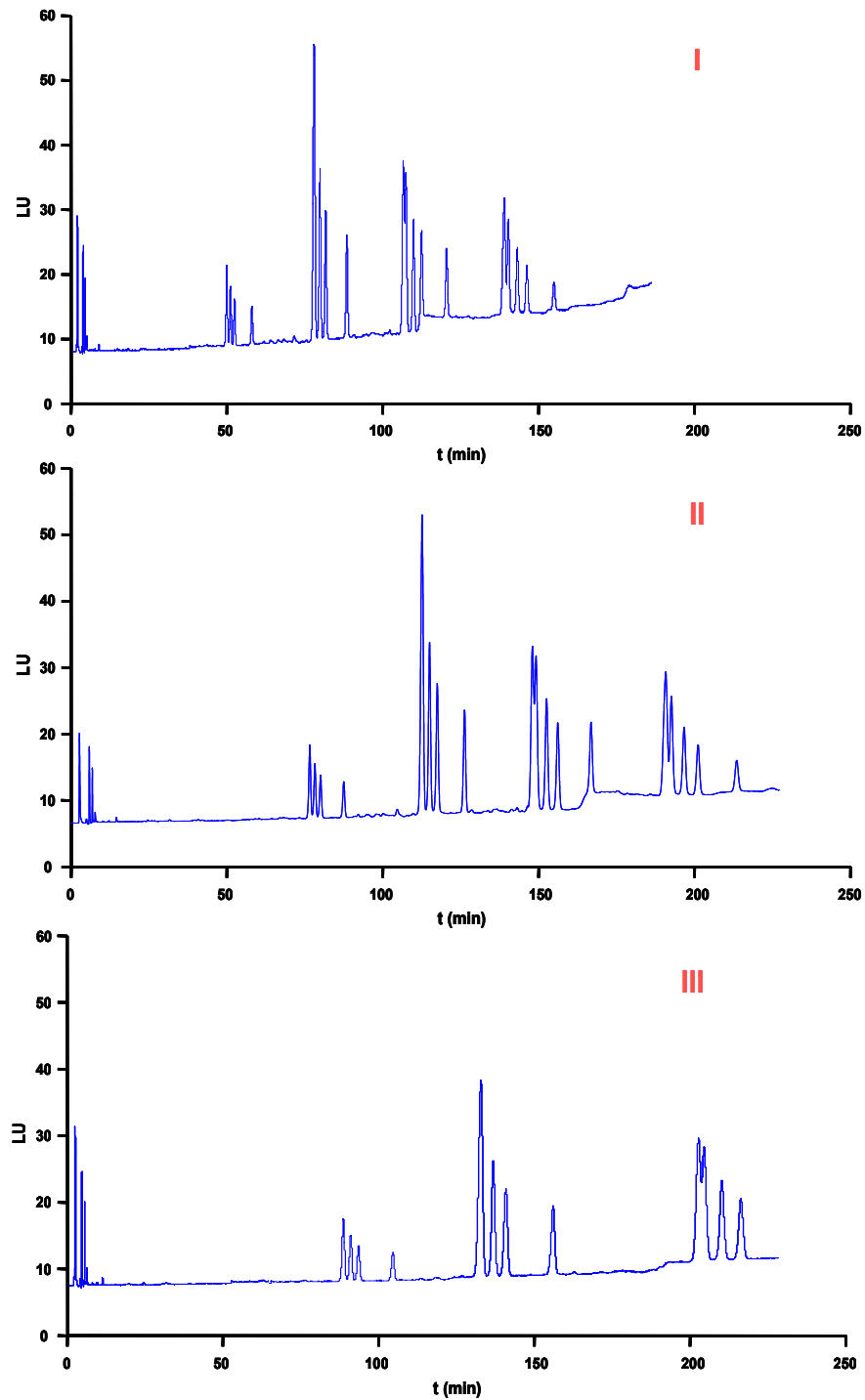


Figura 3.12 - Cromatogramas realizados con diferentes gradientes de composición

**Tabla 3.10** - Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Columnas	2 LiChrospher RP <sub>18</sub> 250x4.6 mm (5 μm)
Inyección	100 μL
Flujo	1.0 - 0.25 mL·min <sup>-1</sup> (I): 0 - 160 min; (II): 0 - 240 min; (III): 0 - 320 min
Temperatura	40°C
Fase Móvil	A: ACN / B: SDS 5 mM A: 20% - 50 % → (I): en 160 min; (II) en 240 min; (III) en 320 min
Detección	λ <sub>exc</sub> : 230 nm / λ <sub>em</sub> : 308 nm
Ganancia	12

En la **Tabla 3.11** se muestran los valores de resolución correspondientes a los isómeros 4 y 5 fenilo del homólogo C<sub>10</sub>. En ella se puede apreciar como los tiempos de análisis se incrementan considerablemente a medida en que se atenúa la pendiente del gradiente, sin que mejore sensiblemente la resolución obtenida. Por tanto se eligió un gradiente de 20% - 50% ACN en 160 minutos para llevar a cabo este análisis.

**Tabla 3.11** - Influencia del gradiente de composición sobre la resolución de isómeros

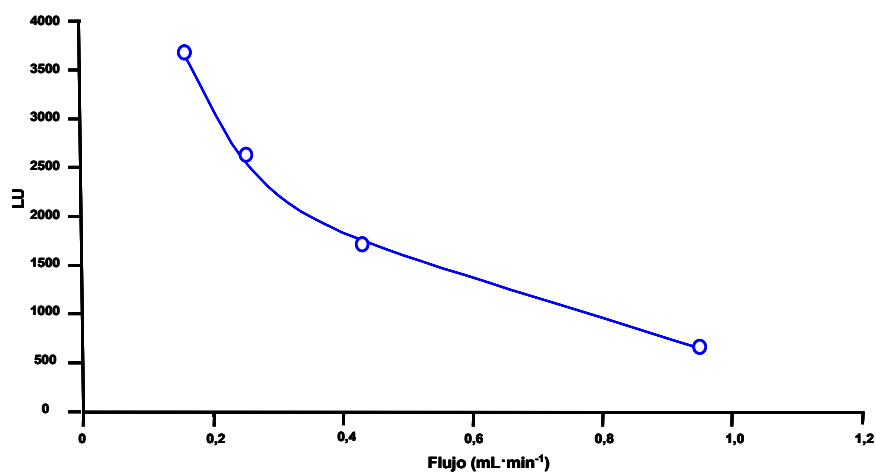
R <sub>s</sub> (5Ø-4Ø C <sub>10</sub> )	R <sub>s</sub> (5 y 6Ø-4Ø C <sub>13</sub> )
1.47	0.88
1.51	0.88
1.58	0.91

### 2.3 - Influencia del flujo de la fase móvil

Este es un factor fundamental en la optimización de un método cromatográfico ya que afecta a aspectos diversos, entre los que cabe destacar: sensibilidad, resolución y tiempo de retención.

El rango operativo de la bomba cuaternaria de que dispone el cromatógrafo comprende desde 0.2 hasta 5 mL·min<sup>-1</sup>; no obstante fue estudiado flujos comprendidos entre 0.25 a 1 mL·min<sup>-1</sup>. En la metodología desarrollada para la determinación de homólogos, el flujo se ha fijado en 1 mL·min<sup>-1</sup>. Valor que permite obtener una situación de compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis, ya que la resolución no plantea ninguna dificultad. La optimización se centró en la determinación de isómeros, que son los que presentan una mayor complejidad metodológica.

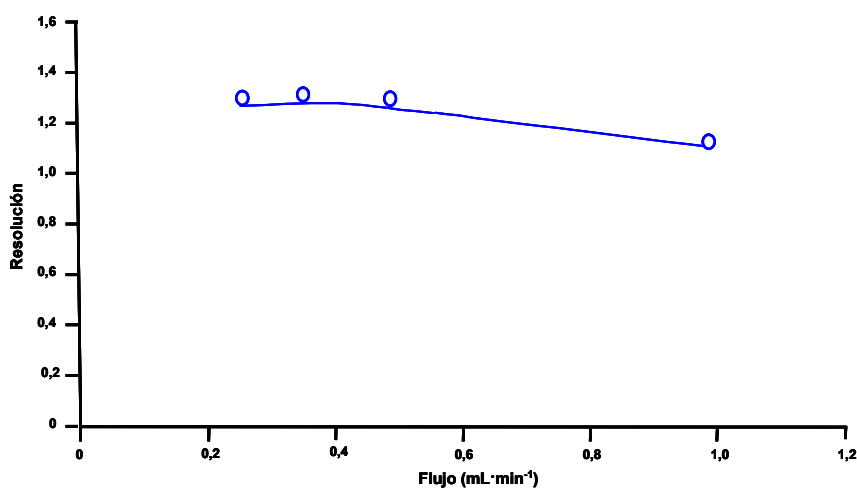
Para evaluar la influencia del flujo de la fase móvil sobre la *sensibilidad* se seleccionó el isómero 2Ø del homólogo C<sub>10</sub>. Los datos obtenidos para las velocidades ensayadas están representados en la **Figura 3.13**.



**Figura 3.13** - Influencia del flujo de la fase móvil sobre la señal de fluorescencia

Los resultados muestran un aumento en la señal fluorescente al disminuir la velocidad de flujo de la fase móvil, siendo este comportamiento común para todos los constituyentes de la mezcla comercial de LAS. Entre otras causas, este aumento en la señal fluorescente podría atribuirse a una menor “dilución” relativa del analito debido a una reducción del flujo de la bomba.

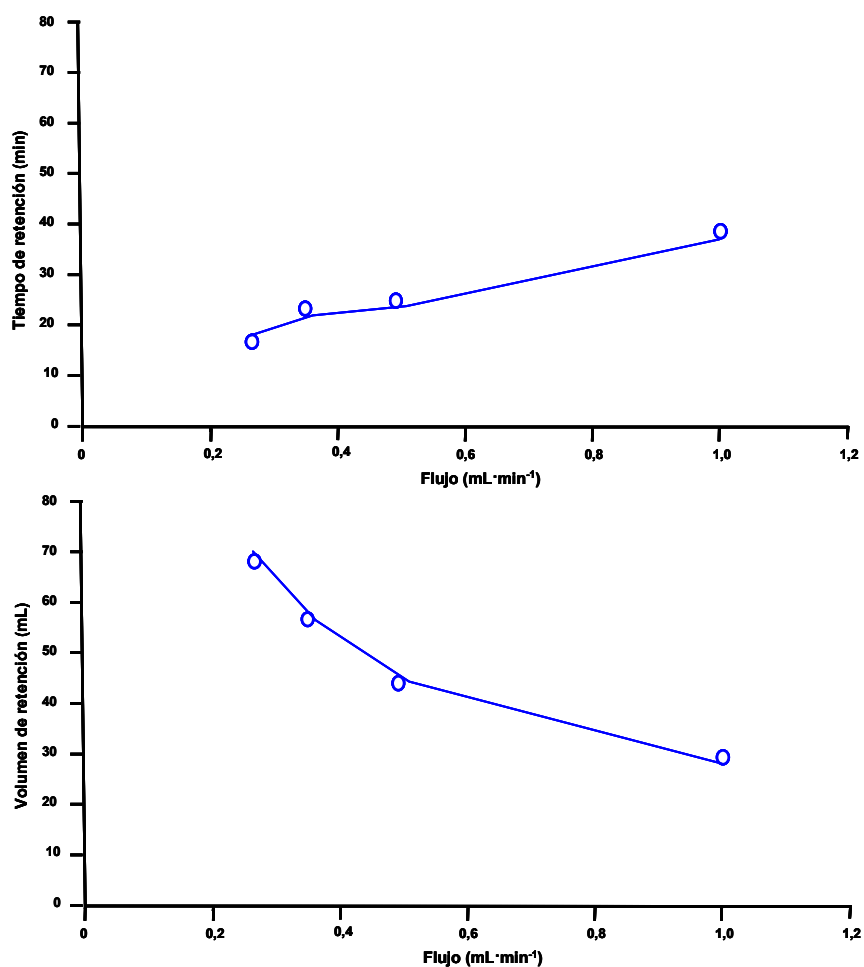
La influencia del flujo de fase móvil sobre la resolución de isómeros se evaluó considerando los isómeros 3 y 4 fenil del homólogo C<sub>10</sub>. Los datos obtenidos se representan en la **Figura 3.14**.



**Figura 3.14** - Influencia del flujo de la fase móvil sobre la resolución de isómeros de LAS

Según se observa la resolución disminuye a medida que aumenta el flujo. Al considerar la influencia del flujo sobre el tiempo de retención de los analitos se observa que el incremento en el tiempo de retención que supone una disminución en el flujo no es tan acusado como cabría esperar. Este hecho indica que el volumen de retención no permanece constante.

Los datos son representados en la **Figura 3.15** y corresponden al isómero  $2\text{Ø}$  del homólogo  $\text{C}_{10}$ :



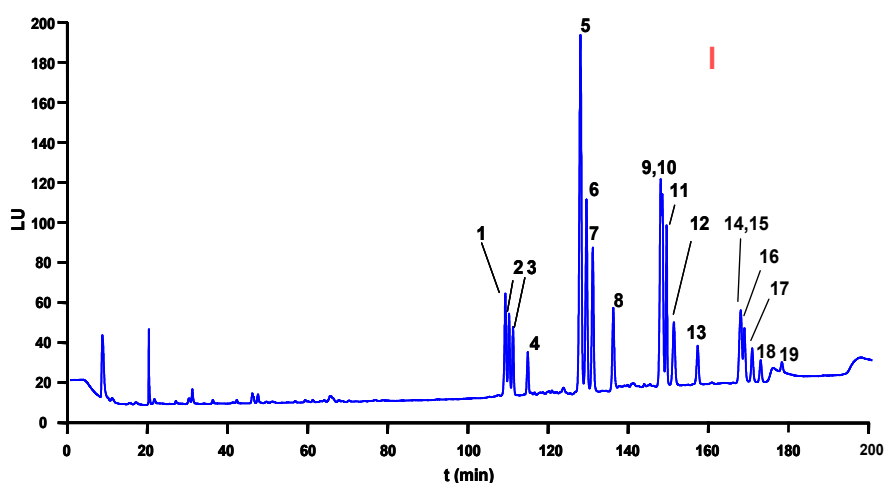
**Figura 3.15** - Influencia del flujo sobre el tiempo y volumen de retención. (Datos referidos al isómero  $2\text{ØC}_{10}$ )

Esto puede ser aplicado para minimizar el volumen de fase móvil utilizada en cada análisis utilizando para ello flujos bajos sin que esto hecho provoque aumentos excesivos en el tiempo de análisis. Como consecuencia de todo lo expuesto, un flujo de  $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

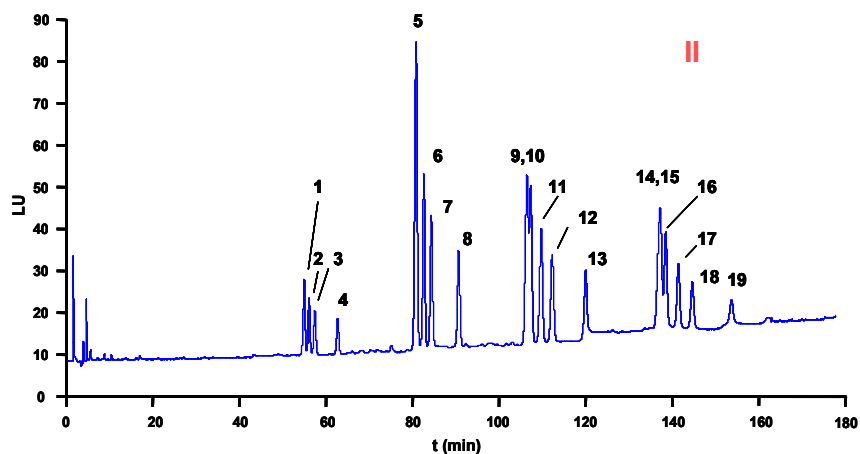
proporciona una sensibilidad y resolución máximas; sin embargo, el tiempo de análisis se incrementa considerablemente.

Para intentar acortar este tiempo se ensayó el empleo de un gradiente de flujo decreciente desde  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . De esta forma se consigue acortar el tiempo de análisis de 182 a 150 minutos, mientras que las resoluciones conseguidas para los isómeros de  $C_{10}$ , que son los primeros a eluirse y, por tanto, los más afectados por la velocidad del flujo alta, siguen siendo satisfactorias.

El resultado de estos ensayos puede ser observado en las *Figuras 3.16* y *3.17*, mostradas a continuación.



**Figura 3.16** - Cromatograma correspondiente al acoplamiento de dos columnas Lichrospher  $C_{18}$  ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ) + Lichrospher  $C_{18}$  ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ) con flujo constante de  $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los picos se identifican como: (1)  $5\text{OC}_{10}$ ; (2)  $4\text{OC}_{10}$ ; (3)  $3\text{OC}_{10}$ ; (4)  $2\text{OC}_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{OC}_{11}$ ; (6)  $4\text{OC}_{11}$ ; (7)  $3\text{OC}_{11}$ ; (8)  $2\text{OC}_{11}$ ; (9)  $6\text{OC}_{12}$ ; (10)  $5\text{OC}_{12}$ ; (11)  $4\text{OC}_{12}$ ; (12)  $3\text{OC}_{12}$ ; (13)  $2\text{OC}_{12}$ ; (14)  $7\text{OC}_{13}$ ; (15)  $6\text{OC}_{13}$ ; (16)  $5\text{OC}_{13}$ ; (17)  $4\text{OC}_{13}$ ; (18)  $3\text{OC}_{13}$ ; (19)  $2\text{OC}_{13}$



**Figura 3.17** - Cromatograma correspondiente al acoplamiento de dos columnas Lichrospher C<sub>18</sub> (250x4.6 mm) + Lichrospher C<sub>18</sub> (250x4.6 mm) con gradiente de flujo de 1 a 0.25 mL·min<sup>-1</sup>. Los picos se identifican como: (1) 5ØC<sub>10</sub>; (2) 4ØC<sub>10</sub>; (3) 3ØC<sub>10</sub>; (4) 2ØC<sub>10</sub>; (5) 5 y 6ØC<sub>11</sub>; (6) 4ØC<sub>11</sub>; (7) 3ØC<sub>11</sub>; (8) 2ØC<sub>11</sub>; (9) 6ØC<sub>12</sub>; (10) 5ØC<sub>12</sub>; (11) 4ØC<sub>12</sub>; (12) 3ØC<sub>12</sub>; (13) 2ØC<sub>12</sub>; (14) 7ØC<sub>13</sub>; (15) 6ØC<sub>13</sub>; (16) 5ØC<sub>13</sub>; (17) 4ØC<sub>13</sub>; (18) 3ØC<sub>13</sub>; (19) 2ØC<sub>13</sub>

Para la obtención de estas dos separaciones cromatográficas, las condiciones empleadas fueron las presentes en la **Tabla 3.12**:

**Tabla 3.12** - Parámetros instrumentales utilizados en el estudio

Condiciones de separación cromatográfica	
Columna	2 LiChrospher C <sub>18</sub> 250x4.6 mm (5 µm)
Inyección	100 µL
Flujo	0.25 mL·min <sup>-1</sup> (200 min) (I) 1 - 0.25 mL·min <sup>-1</sup> (0 - 160 min) (II)
Temperatura	40°C
Fase Móvil	A: ACN / B: SDS 5mM A: 20% - 50 % → (I): en 200 min; (II) en 160 min
Detección	λ <sub>exc.</sub> : 230 nm / λ <sub>em.</sub> : 308 nm
Ganancia	12

#### 2.4 - Estudio de las longitudes de onda de medida

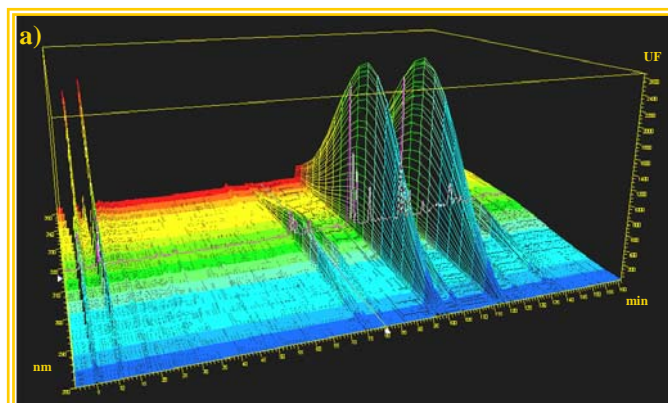
Según la bibliografía descrita, el LAS presenta emisión fluorescente a una longitud de onda próxima a 300 nm y, cuando es excitado, a 230 nm. Estos valores se han tomado como punto de partida para el estudio de las longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas para la determinación de LAS en las diferentes condiciones de trabajo ya descritas para homólogos e isómeros.

El detector de fluorescencia acoplado al cromatógrafo líquido permite realizar barridos tanto de emisión como de excitación de manera casi instantánea a diferentes tiempos a lo largo de todo el cromatograma. Los barridos se realizaron en los siguientes rangos de longitudes de onda:

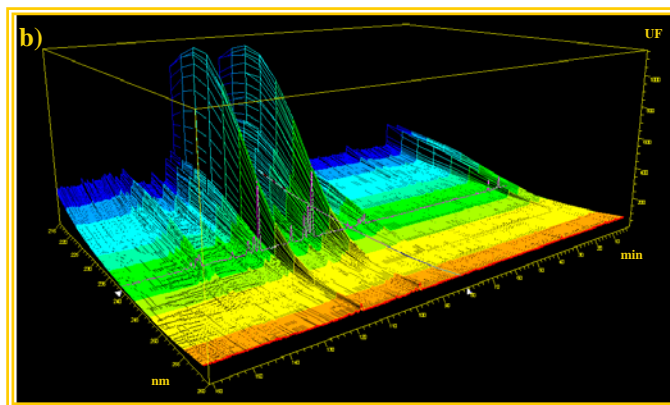
*Excitación: 220 nm - 280 nm*

*Emisión: 250 nm - 350 nm*

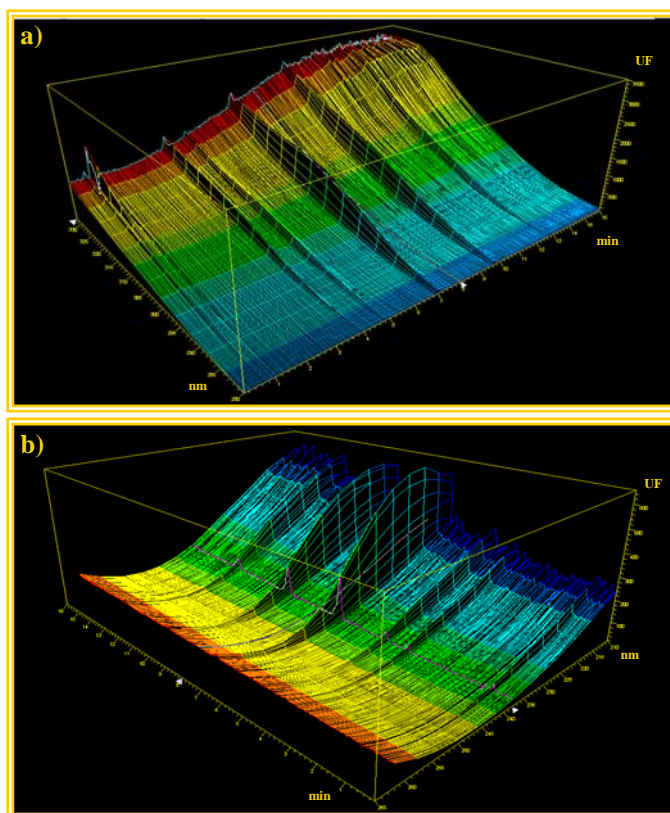
Como resultado de estas experiencias se obtienen las representaciones tridimensionales recogidas en las *Figuras 3.18* y *3.19*, donde en uno de los ejes se sitúa la variable tiempo, en otro se sitúa la longitud de onda de medida y en el tercero se dispone la intensidad de fluorescencia:







**Figura 3.18** - Representaciones en 3D de emisión (a) y excitación (b) para resolución de isómeros



**Figura 3.19** - Representaciones en 3D de emisión (a) y excitación (b) para resolución de homólogos

Como consecuencia de este estudio fueron seleccionadas las longitudes de onda de medida, considerando la máxima relación señal/ruido, recogidas en la **Tabla 3.13**.

**Tabla 3.13** - Longitudes de onda de medida

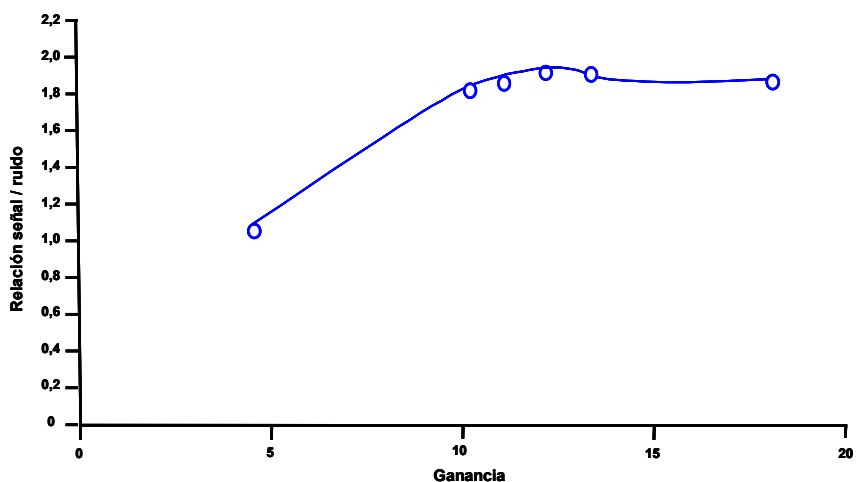
	Determinación de homólogos	Determinación de isómeros
$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	230	230
$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	290	308

Según se puede observar, la longitud de onda de excitación máxima coincide para el medio metanol/agua empleado en el método de resolución de homólogos y para el medio acetonitrilo/agua usado en el caso de isómeros. Sin embargo se observa un desplazamiento batocrómico de 18 nm al cambiar la fase móvil de metanol/agua a acetonitrilo/agua.

## 2.5 - Influencia de la ganancia del tubo fotomultiplicador

El detector de fluorescencia empleado ofrece además la posibilidad de modificar el voltaje aplicado al fotomultiplicador mediante el control de la “ganancia” en un intervalo de 1 a 18. En este apartado se estudia la influencia de este factor en la señal analítica obtenida mediante la evaluación de la relación señal/ruido a diferentes valores de ganancia. Para esto, se toma como referencia el homólogo C<sub>10</sub>, siendo su cuantificación realizada por medio de la relación de la altura de pico desde la base del cromatograma y por la altura del ruido de fondo que aparece junto a este pico.

Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la **Figura 3.20**.



**Figura 3.20** - Influencia de la ganancia del fotomultiplicador sobre la relación señal/ruido

Como se puede observar la mayor relación señal/ruido se obtiene cuando la ganancia se fija en un valor de 13, seleccionándolo como ganancia a trabajar en los siguientes experimentos.

## 2.6 - Influencia de la temperatura de la columna

La temperatura de columna debe ser controlada para obtener así resultados reproducibles, ya que tanto la viscosidad de la fase móvil como el rendimiento de fluorescencia de los analitos son fenómenos que se ven influenciados en gran medida por este factor. Por tanto, se debe trabajar con un sistema capaz de controlar la temperatura de la columna.

Un aumento en la temperatura representa una disminución en la viscosidad de la fase móvil y una disminución por tanto de la presión del sistema, mejorando

así la eficiencia de la separación, pero a su vez también implica una disminución en la señal de fluorescencia emitida por los analitos. Además, a temperaturas elevadas se puede producir la hidrólisis de la fase estacionaria y la consiguiente pérdida de eficacia y resolución en la separación. En la **Tabla 3.14** se muestra la variación en el tiempo de retención y la resolución provocada por una variación en la temperatura del sistema:

**Tabla 3.14** - Tiempo de retención y resolución a diferentes temperaturas de trabajo

Temperatura de la columna	Area *	Tiempo de retención *	Resolución **	Presión ***
20°C	599.6	62.8 min	1.50	275 bar
30°C	576.1	59.0 min	1.48	240 bar
40°C	544.4	54.9 min	1.47	200 bar
60°C	490.5	47.4 min	1.34	150 bar

\* Datos referidos al primer pico de la mezcla de LAS (5 $\phi$  C<sub>10</sub>)

\*\* Resolución referida a la pareja formada por los isómeros 5 y 4 $\phi$  C<sub>10</sub>

\*\*\* Presión referida a condiciones iniciales de composición de la fase móvil

Así que se escogió una temperatura de 40° C como solución de compromiso entre eficacia de la columna, sensibilidad y aumento de la vida útil de la columna.

## 2.7 - Influencia del volumen de inyección

En este apartado se describe cómo afecta el volumen de muestra inyectado sobre la resolución y la sensibilidad. Se estudió volúmenes de inyección que variaron entre 5 y 100  $\mu$ L.

Cabría esperar que la anchura de banda se incrementara a medida que se

aumenta el volumen de inyección; sin embargo, los resultados obtenidos, mostrados en la **Tabla 3.15**, ponen de manifiesto que este parámetro prácticamente no afecta a la resolución de los isómeros 4 y 5 $\Delta$  del homólogo C<sub>10</sub> utilizados como referencia. También se observa, sin embargo, un notable incremento en el área del pico cromatográfico correspondiente al isómero 2 $\Delta$  del homólogo C<sub>10</sub> seleccionado para el estudio, aunque el comportamiento es extensible a cualquiera de los picos cromatográficos implicados. De hecho el aumento experimentado al pasar de 5 a 100  $\mu$ L es del 1800% lo cual implica un aumento sustancial en la sensibilidad del método.

**Tabla 3.15** - Influencia del volumen de inyección sobre la resolución y la sensibilidad

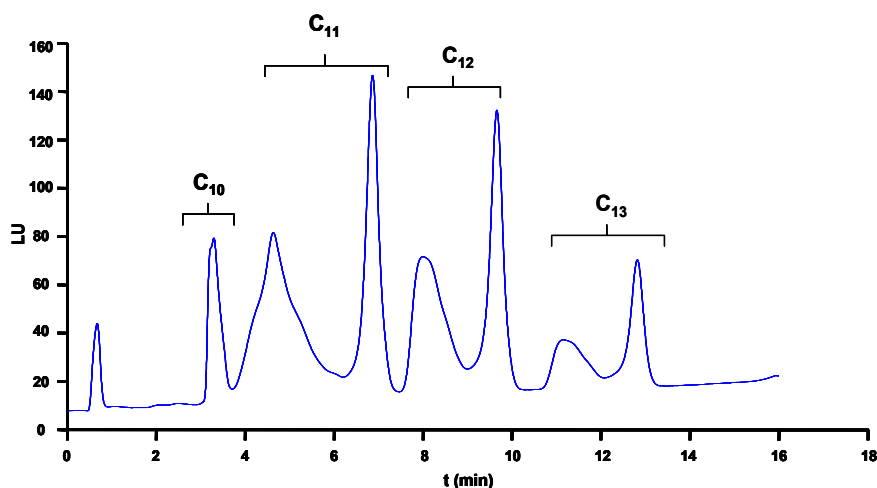
Volumen de inyección	Resolución	Area
5 $\mu$ L	1.13	108.1
10 $\mu$ L	1.12	191.0
30 $\mu$ L	1.12	600.2
50 $\mu$ L	1.11	974.2
100 $\mu$ L	1.10	1937.3

Se optó, por tanto, por utilizar el volumen de inyección máximo de 100  $\mu$ L tanto en el método propuesto para isómeros como en el de homólogos.

## 2.8 - Influencia del porcentaje de metanol en el volumen de inyección

Un aspecto destacable es que cuando la muestra a analizar se encuentra disuelta en un medio con una fuerza elutrópica más elevada que la que posee la fase móvil, como por ejemplo con un 100% metanol, aparecen hombros

muy pronunciados que acompañan a cada familia de homólogos, así como a los picos correspondientes a cada isómero, impidiendo la adecuada integración e interpretación de los datos analíticos obtenidos y dificultando la resolución de los isómeros. Esto se puede visualizar en la **Figura 3.21**.

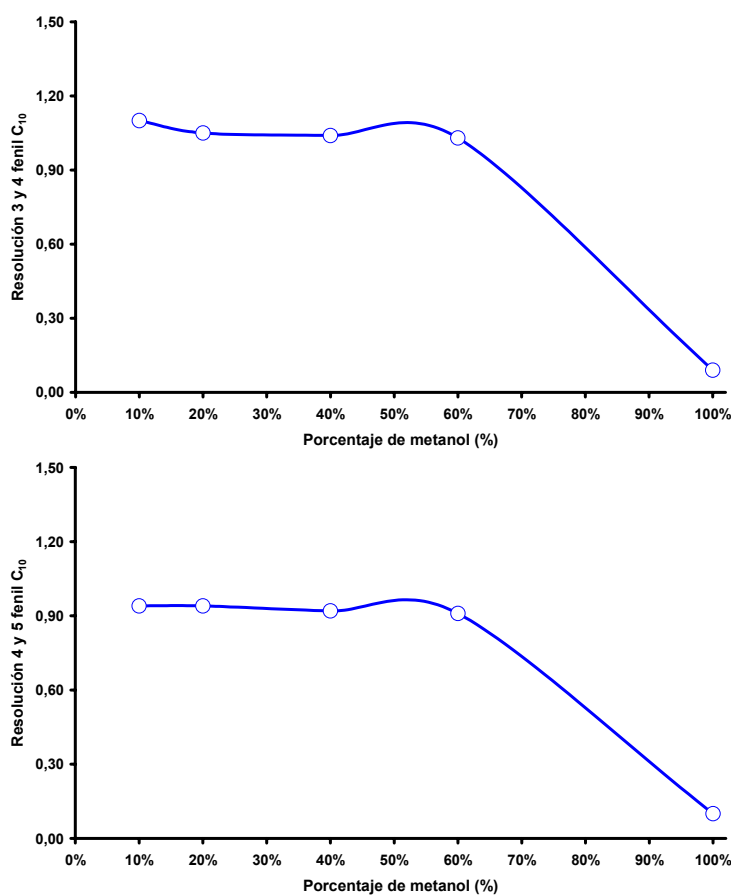


**Figura 3.21** - Cromatograma realizado inyectando los analitos disueltos en un 100% de MetOH

Sin embargo, cuando se inyectan muestras disueltas en agua al 100%, este fenómeno no aparece, obteniéndose picos cromatográficos con una línea base poco pronunciada y sin hombros que entorpezcan la adecuada cuantificación. Además se comprueba que el área total de cada familia de homólogos, incluyendo el hombro, se mantiene constante respecto a muestras de la misma naturaleza y concentración pero disueltas en agua. Este hecho podría indicar por tanto que esos hombros son debidos a una variación en la velocidad de migración de una porción del propio analito.

Para evitar este fenómeno se estudió la influencia que el contenido en metanol de las muestras ejerce sobre el comportamiento cromatográfico de los diferentes componentes del LAS. Para ello se estudió la influencia

de esta variable en las muestras, analizando las siguientes proporciones de metanol: 10%; 20%; 40%; 60%; 100%. Los resultados se refieren a los valores de resolución entre los isómeros 3 - 4 $\emptyset$  y 4 - 5 $\emptyset$  del homólogo C<sub>10</sub>, utilizados como referencia, y se representan en la **Figura 3.22**.



**Figura 3.22** - Influencia del porcentaje de metanol en las muestras. (Datos referidos al método de resolución de isómeros)

De estos resultados obtenidos, se puede deducir que, a medida que aumenta la proporción de metanol en el volumen de inyección, se produce una ligera disminución con una tendencia gradual de pérdida de la resolución

de los picos, llegando al caso extremo de la aparición de esos hombros cuando se emplea una proporción cercana al 100% en metanol (*Figura 3.21*). Se eligió la proporción conteniendo 60% de metanol (3:2 MetOH/H<sub>2</sub>O) pues la resolución apenas se veía afectada, además de desaparecer los hombros en todos los cromatogramas obtenidos.

## 2.9 - Conclusiones generales

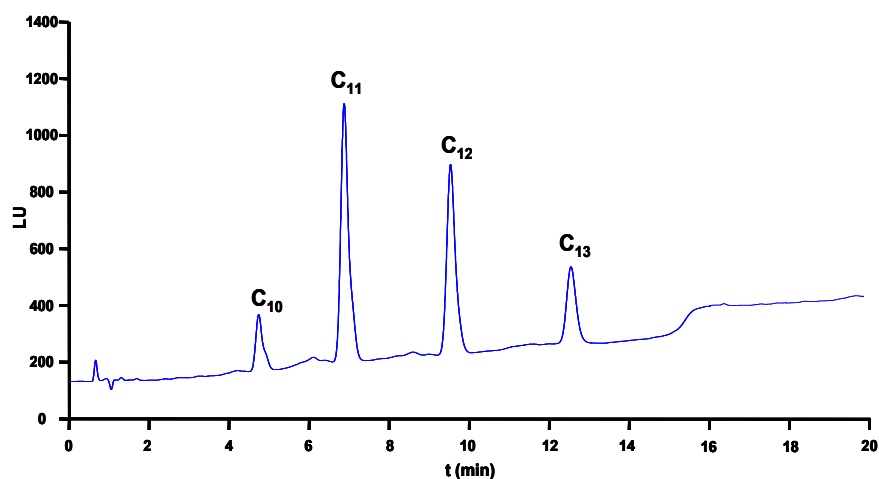
Como conclusión general de este estudio, se puede definir dos metodologías diferentes dependiendo del nivel de resolución que se quiera obtener: determinación de homólogos e isómeros de LAS. En la *Tabla 3.16* se recogen los valores óptimos seleccionados para cada uno de los parámetros ensayados:

*Tabla 3.16 - Resumen de los parámetros cromatográficos empleados para las distintos grados de resolución del LAS*

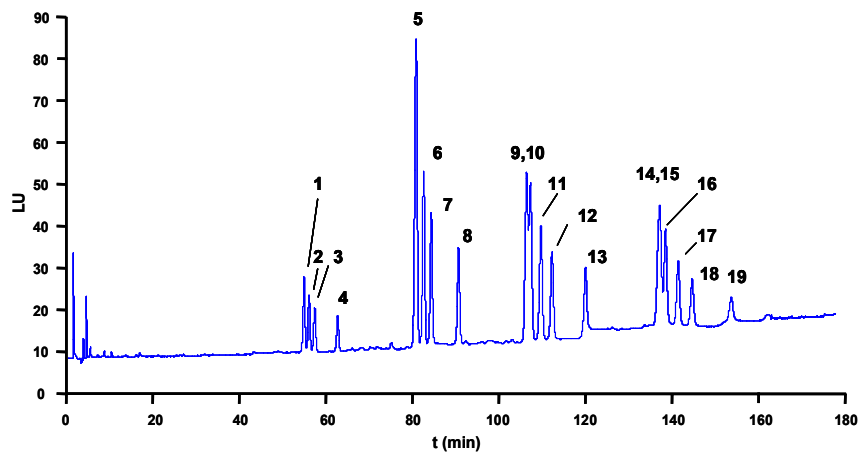
	Resolución de homólogos de LAS	Resolución de isómeros de LAS
Columna	Lichrospher RP-C <sub>8</sub>	2 x Lichrospher RP-C <sub>18</sub> (acopladas)
Fase móvil	MetOH / SDS 30mM	ACN / SDS 5mM
Gradiente	0 - 15 min 55% - 70% MetOH	0 - 160 min 20% - 50% ACN
Flujo	1 mL·min <sup>-1</sup>	1 mL·min <sup>-1</sup> - 0.25 mL·min <sup>-1</sup> en 160 min
$\lambda_{ex}$	230 nm	230 nm
$\lambda_{em}$	290 nm	308 nm
Ganancia del fotomultiplicador	13	
Temperatura de columna	40 °C	
Volumen de inyección	100 $\mu$ L	



En las *Figuras 3.23* y *3.24*, se muestra los cromatogramas correspondientes tanto a la determinación de homólogos e isómeros de LAS, respectivamente.



*Figura 3.23* - Cromatograma correspondiente a la determinación de homólogos



*Figura 3.24* - Cromatograma correspondiente a la determinación de isómeros. Los picos se identifican como: (1) 5 $\varnothing$ C<sub>10</sub>; (2) 4 $\varnothing$ C<sub>10</sub>; (3) 3 $\varnothing$ C<sub>10</sub>; (4) 2 $\varnothing$ C<sub>10</sub>; (5) 5 y 6 $\varnothing$ C<sub>11</sub>; (6) 4 $\varnothing$ C<sub>11</sub>; (7) 3 $\varnothing$ C<sub>11</sub>; (8) 2 $\varnothing$ C<sub>11</sub>; (9) 6 $\varnothing$ C<sub>12</sub>; (10) 5 $\varnothing$ C<sub>12</sub>; (11) 4 $\varnothing$ C<sub>12</sub>; (12) 3 $\varnothing$ C<sub>12</sub>; (13) 2 $\varnothing$ C<sub>12</sub>; (14) 7 $\varnothing$ C<sub>13</sub>; (15) 6 $\varnothing$ C<sub>13</sub>; (16) 5 $\varnothing$ C<sub>13</sub>; (17) 4 $\varnothing$ C<sub>13</sub>; (18) 3 $\varnothing$ C<sub>13</sub>; (19) 2 $\varnothing$ C<sub>13</sub>

### **2.10 - Análisis cromatográfico para el LAS total**

Además de desarrollar dos grados de resolución (homólogos e isómeros) para el análisis del LAS, también fue realizado otro grado más de resolución: para el LAS total.

En este caso, no ocurriría separación cromatográfica, de hecho no se emplea ningún tipo de columna o fase estacionaria. Solamente, por este análisis, se contempla la determinación de todos los integrantes del compuesto solapados en un sólo pico cromatográfico, es decir, no se trata de separar sino de agrupar todas las especies químicas en una única señal instrumental.

Una de las ventajas que puede proporcionar este tipo de evaluación es que podría ser útil en ensayos de selección (*screening tests*) ya que con un tiempo muy reducido, menos de 1 minuto, se podría determinar el contenido de LAS en las muestras analizadas.

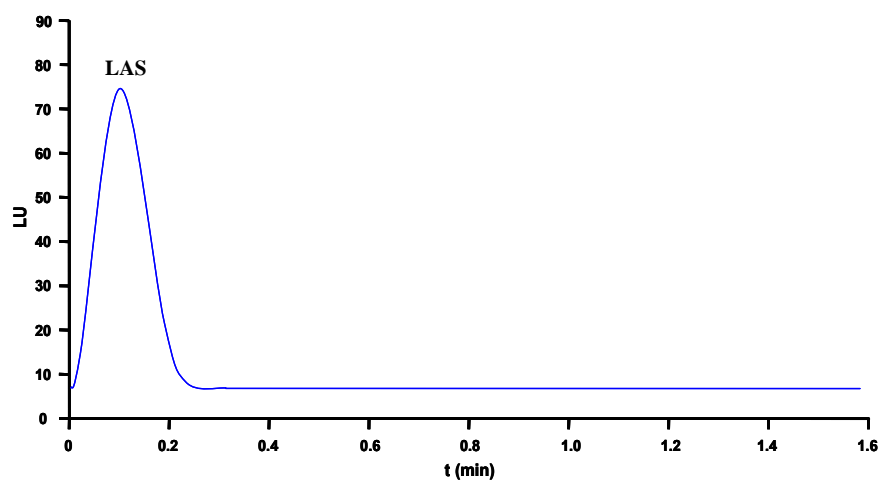
Con esta finalidad se utilizaría el sistema cromatográfico como un aparato responsable por realizar un análisis por inyección en flujo (*Flow Injection Analysis*).

El empleo del análisis por inyección en flujo juntamente con la cromatografía es muy sencillo y se fundamenta en la inserción de una alícuota de la disolución de la muestra, que sufre dispersión al ser conducida a través del trayecto analítico por la fase móvil empleada hasta el detector.

Abajo se representa las condiciones empleadas para la realización del análisis cromatográfico y un cromatograma.

**Tabla 3.17 - Condiciones cromatográficas**

	Resolución para LAS total
Columna	-
Fase móvil	ACN
Isocrático	0 - 1.6 min 100% ACN
Flujo	1 mL·min <sup>-1</sup>
$\lambda$	exc.: 230 nm / em.: 308 nm
Ganancia del fotomultiplicador	13
Temperatura de columna	20 °C
Volumen de inyección	100 $\mu$ L



**Figura 3.25 - Cromatograma correspondiente a la determinación de LAS total**

### 3 - OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS EN LA SPE

A continuación se comenta la optimización de la etapa de purificación y/o concentración empleando la Extracción en Fase Sólida.

#### 3.1 - Selección del volumen de eluyente (metanol)

Se debe llevar en consideración que tanto en el caso del tratamiento de muestras acuosas como sólidas hay que realizar un proceso de purificación y/o preconcentración mediante, por ejemplo, la SPE antes de la separación cromatográfica. En esta etapa y para esta finalidad, la elución final de los analitos puede ser realizada mediante la utilización de un disolvente orgánico como el metanol. En el caso específico de la elución de los componentes del LAS, el volumen de metanol empleado debe ser el adecuado de forma a que no haya una reducción de la señal de sus componentes más hidrofóbicos, es decir, aquellos que presentan un mayor número de carbonos en la cadena alquílica y, por ende, mayor retención en la fase estacionaria empleada (C<sub>18</sub>), ya que la extracción de estos componentes se favorece al aumentar el volumen de agente eluyente en la SPE. Por tanto, para que la extracción de todos los componentes del LAS sea la más cuantitativa posible, se debe utilizar la mayor cantidad posible de metanol en la fase de elución en la SPE minimizando las pérdidas que pueden ocurrir.

Con esta finalidad, se estudió la influencia del volumen de elución (metanol) en la recuperación de los isómeros 2ØC<sub>10</sub> (relativamente menos hidrofóbico), 2ØC<sub>13</sub> (relativamente más hidrofóbico) y del LAS total. Los analitos fueron preparados con una concentración de 10.0 mg·L<sup>-1</sup>, donde 10 mL fueron sometidos a la SPE. La elución fue realizada con las cantidades

de metanol probadas y todos los eluatos fueron enrasados a un volumen de 10 mL respetando la proporción hidrometanólica de 3:2. Se procedió el análisis de sus respectivas áreas comparadas con el área de los mismos patrones pero que no habían sido sometidos a la *SPE* conteniendo la misma concentración de  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En la **Tabla 3.18**, se puede observar este efecto.

**Tabla 3.18** - Recuperación de los analitos en función del volumen de metanol empleado en la elución de la *SPE*

Volumen (mL)	2ØC <sub>10</sub> (%)	2ØC <sub>13</sub> (%)	LAS total (%)
0.5	61.3	42.9	60.1
1.0	100.0	76.2	92.6
2.0	96.0	87.4	95.0
3.0	99.2	95.9	98.1

Consecuentemente para los experimentos posteriores fue empleado un volumen de metanol de 3.0 mL.

### 3.2 - Procedimiento Operatorio para la Extracción en Fase Sólida

Por lo general, en la literatura científica actual hay muchas aplicaciones de la *SPE* empleando como fase estacionaria C<sub>18</sub> entre otras, para la purificación y/o concentraciones de muestras ambientales que presentan LAS. Esto se puede comprobar en la **Tabla 1.12**.

En lo que se refiere a las condiciones y reactivos utilizados, en la **Tabla 3.19**,

se representa de forma sucinta el procedimiento operatorio adoptado para el tratamiento de muestras acuosas:

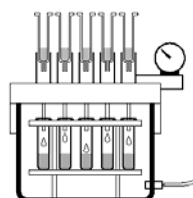
**Tabla 3.19 - SPE para muestras acuosas**

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos C <sub>18</sub> <i>MERCK</i>	1) Acondicionamiento	5 mL MetOH + 5 mL H <sub>2</sub> O, flujo: 2 - 3 mL·min <sup>-1</sup>
	2) Carga	25 mL muestra acuosa
	3) Lavado	3 mL MetOH/H <sub>2</sub> O (35:65)
	4) Elución	3 mL MetOH

Tras la elución de la *SPE*, se realizó la evaporación total del disolvente del eluato sometiéndole a una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, siendo después redisoluelto con un volumen de 1.0 mL de una disolución hidrometanólica formada por 3 MetOH: 2 H<sub>2</sub>O. De esta forma, además de proporcionar la purificación química también se realizó una concentración de veinticinco veces.

Por tratarse inicialmente de disoluciones compuestas solamente con patrones no fue necesaria una etapa de eliminación de posibles partículas en suspensión. Ahora bien, tratándose de muestras medioambientales acuosas, para analizarlas es imprescindible su filtración o centrifugación. Con esta finalidad las muestras estudiadas fueron centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos para eliminar así la materia en suspensión. A continuación, una alícuota fue pasada a través de un cartucho de extracción en fase sólida relleno con C<sub>18</sub>, quedando retenidos los analitos por procesos de adsorción hidrofóbica. El cartucho fue lavado con una

mezcla hidrometanólica que elimina los interferentes más polares sin arrastrar al LAS retenido. Finalmente los analitos fueron eluidos con 3 mL de metanol asegurando así la cuantitividad de la extracción. Para la ejecución de este proceso (Extracción en Fase Sólida), fue necesaria la utilización de una cámara de vacío que posee una serie de canales mediante los cuales se puede controlar el flujo del proceso de extracción, conocido también como sistema o cámara de vacío múltiple. Esta cámara se describe en la **Figura 3.26**.



**Figura 3.26** - Cámara de vacío múltiple utilizada en el proceso de Extracción en Fase Sólida

Mediante esta etapa (*SPE*) se eliminan los posibles interferentes que puedan acompañar al LAS en las muestras acuosas a las que se les va a aplicar el método cromatográfico; también se eliminan aquellas sustancias que posean un carácter más polar que el LAS pues no serán retenidas por el absorbente que contiene el cartucho de extracción en fase sólida, y aquellas que tengan una naturaleza más hidrofóbica pues quedarán fuertemente retenidas en el cartucho después del proceso de elución. Además de eliminar los interferentes, esta etapa desempeña una función de preconcentración del analito, ya que el volumen total que se hace pasar por el cartucho es de 25 mL y el volumen final al que se lleva, una vez reconstituido, es de 1.0 mL, con lo que el factor de preconcentración en este caso es de 25.

Finalmente, esta disolución concentrada de *LAS* resultante, se introduce en un vial y se procede a su análisis cromatográfico tal y como se describe en el apartado anterior.

#### **4 - PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE *LAS* EN MUESTRAS ACUOSAS**

A continuación se comentan los parámetros analíticos conseguidos tras la obtención de los datos experimentales.

##### **4.1 - Establecimiento y verificación del modelo**

El modelo de calibración seleccionado fue el linear de regresión univariante por mínimos cuadrados. Se buscan los parámetros *a* y *b* partiendo de una serie de puntos experimentales correspondientes a la señal cromatográfica y a los valores de concentración del analito en cuestión.

Para establecer las funciones de calibrado se siguió el procedimiento que se describe a continuación. En una serie de catorce matraces aforados de 25 mL de capacidad volumétrica, se prepararon distintas concentraciones de patrones (0.00; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 2.00 y 4.00 mg·L<sup>-1</sup>) y tras enrasar con agua Milli-Q, se sometieron al procedimiento operatorio descrito en el apartado anterior sobre la *SPE*. Cada punto experimental tuvo una réplica.

Los parámetros estadísticos del modelo calculado para el método de determinación de homólogos de *LAS*, son los que se pueden apreciar en la **Tabla 3.20**.



**Tabla 3.20** - Parámetros estadísticos para la determinación de homólogos de LAS

Homólogos	b (L·µg <sup>-1</sup> )	S <sub>b</sub>	a	S <sub>a</sub>	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>y/x</sub>	P <sub>lof</sub> (%)
C <sub>10</sub>	0.8190	10.49	16.21	5.84	99.93	2.46	30.6
C <sub>11</sub>	0.8103	9.31	53.84	17.84	99.95	7.53	20.0
C <sub>12</sub>	0.7732	12.13	28.53	19.14	99.90	4.95	94.8
C <sub>13</sub>	0.7197	17.64	-0.17	16.83	99.76	4.89	97.4

Según la metodología descrita para la resolución de isómeros de LAS, los resultados estadísticos calculados para el modelo se muestran en la **Tabla 3.21**.

**Tabla 3.21** - Parámetros estadísticos del método para la determinación de isómeros de LAS

Isómeros	b (L·µg <sup>-1</sup> )	S <sub>b</sub>	a	S <sub>a</sub>	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>y/x</sub>	P <sub>lof</sub> (%)
2ØC <sub>10</sub>	1.6028	23.70	5.99	3.12	99.89	2.89	9.1
3ØC <sub>10</sub>	1.8945	29.64	8.33	3.92	99.88	4.17	5.2
4ØC <sub>10</sub>	2.5641	35.27	14.24	4.41	99.91	5.90	9.9
5ØC <sub>10</sub>	1.9438	27.75	9.41	4.66	99.90	3.11	6.7
2ØC <sub>11</sub>	1.2082	13.94	11.40	4.99	99.93	4.23	71.8
3ØC <sub>11</sub>	2.4292	31.61	34.25	11.86	99.92	4.37	35.4
4ØC <sub>11</sub>	3.0444	36.35	44.27	14.06	99.93	10.66	27.8
5+6ØC <sub>11</sub>	3.1020	37.06	74.12	29.07	99.93	22.33	20.6
2ØC <sub>12</sub>	2.0196	47.52	17.36	12.24	99.72	10.10	97.7
3ØC <sub>12</sub>	2.6516	53.60	22.88	14.16	99.80	15.38	96.4
4ØC <sub>12</sub>	3.3055	61.66	34.36	16.84	99.83	6.61	92.5
5+6ØC <sub>12</sub>	3.2697	58.17	97.33	45.39	99.84	23.87	89.9

Tabla 3.21 - Continuación

Isómeros	b (L·µg <sup>-1</sup> )	S <sub>b</sub>	a	S <sub>a</sub>	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>y/x</sub>	P <sub>lof</sub> (%)
2ØC <sub>13</sub>	1.8053	59.52	6.08	7.19	99.45	8.48	99.3
3ØC <sub>13</sub>	2.6445	85.36	4.45	12.00	99.48	8.99	98.7
4ØC <sub>13</sub>	3.2453	105.15	5.10	15.97	99.48	19.15	98.6
5+6+7ØC <sub>13</sub>	3.5831	97.04	47.60	52.70	99.62	42.28	98.7

#### 4.2 - Verificación del modelo

Para la verificación del modelo, se realizaron los siguientes estudios:

- 1) Evaluación del *fallo de ajuste* ( $P_{Lof}$ ), para determinar la tendencia lineal de los datos. Como se observa en la **Tabla 3.20** y en la **3.21**, en todos los casos el valor P fue mayor del 5%, por tanto se concluye que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustan a un modelo lineal.
- 2) Evaluación de la condición de *homocedasticidad*, es decir, homogeneidad de varianzas. Con esta finalidad se empleó el análisis visual de los gráficos de los residuos. Mediante este análisis, se observa que se cumplen las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

#### 4.3 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de este parámetro, fue utilizada la forma descrita en la opción **d** del apartado **6.3.4** del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos**.

Se prepararon siete disoluciones blanco que se extrajeron según el procedimiento operatorio descrito anteriormente y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos fijando las condiciones instrumentales descritas en la **Tablas 3.22** y **3.23**. Los resultados obtenidos son los mostrados en las tablas siguientes.

**Tabla 3.22** - Valores de  $W_{0.5h}$ ,  $W_{bo}$  y de los intervalos de integración para la determinación de homólogos

Homólogos de LAS	$W_{0.5h}$	$W_{bo}$	$t_R \pm 0.5 W_{bo}$
C <sub>10</sub>	0.33	0.84	4.7 ± 0.4
C <sub>11</sub>	0.26	0.66	6.8 ± 0.3
C <sub>12</sub>	0.27	0.69	9.4 ± 0.3
C <sub>13</sub>	0.28	0.71	12.4 ± 0.4

**Tabla 3.23** - Valores de  $W_{0.5h}$ ,  $W_{bo}$  y de los intervalos de integración para la determinación de isómeros

Isómeros de LAS	$W_{0.5h}$	$W_{bo}$	$t_R \pm 0.5 W_{bo}$
2ØC <sub>10</sub>	0.49	1.25	62.6 ± 0.6
3ØC <sub>10</sub>	0.47	1.20	57.3 ± 0.6
4ØC <sub>10</sub>	0.47	1.20	56.0 ± 0.6
5ØC <sub>10</sub>	0.46	1.17	54.9 ± 0.6
2ØC <sub>11</sub>	0.54	1.38	90.2 ± 0.7
3ØC <sub>11</sub>	0.53	1.35	84.0 ± 0.7
4ØC <sub>11</sub>	0.52	1.32	82.2 ± 0.7
5+6ØC <sub>11</sub>	0.63	1.60	80.5 ± 0.8
2ØC <sub>12</sub>	0.65	1.66	119.1 ± 0.8

**Tabla 3.23 - Continuación**

Isómeros de LAS	$W_{0.5h}$	$W_{bo}$	$t_R \pm 0.5 W_{bo}$
3ØC <sub>12</sub>	0.64	1.63	111.5 ± 0.8
4ØC <sub>12</sub>	0.65	1.66	109.0 ± 0.8
5+6ØC <sub>12</sub>	1.49	3.79	105.8 ± 1.9
2ØC <sub>13</sub>	0.83	2.11	152.4 ± 1.1
3ØC <sub>13</sub>	0.76	1.94	143.5 ± 1.0
4ØC <sub>13</sub>	0.74	1.89	140.4 ± 1.0
5+6+7ØC <sub>13</sub>	1.73	4.41	136.8 ± 2.2

A partir de los intervalos  $t_R \pm 0.5 W_b$  se calcularon las señales correspondientes a los blancos para cada uno de los compuestos en estudio. Teniendo en cuenta las señales del blanco, se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación a partir de las expresiones anteriormente definidas.

Los resultados se presentan en las **Tablas 3.24** y **3.25**.

**Tabla 3.24 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de homólogos**

Homólogos	$S_0^*$	$b$ (L·µg <sup>-1</sup> )	LD (µg·L <sup>-1</sup> )	LQ (µg·L <sup>-1</sup> )
C <sub>10</sub>	0.44	0.8190	1.6	5.3
C <sub>11</sub>	1.05	0.8103	3.9	13.0
C <sub>12</sub>	0.82	0.7732	3.2	10.7
C <sub>13</sub>	2.40	0.7197	2.6	8.7

\*  $S_0$ : desviación estándar obtenida para las siete disoluciones de blanco

Tabla 3.25 - Límite de detección y cuantificación para la determinación de isómeros

Isómeros	S <sub>0</sub> *	b (L·µg <sup>-1</sup> )	LD (µg·L <sup>-1</sup> )	LQ (µg·L <sup>-1</sup> )
2ØC <sub>10</sub>	0.64	1.6028	1.2	4.0
3ØC <sub>10</sub>	0.69	1.8944	1.1	3.7
4ØC <sub>10</sub>	1.62	2.5641	1.9	6.3
5ØC <sub>10</sub>	0.52	1.9438	0.8	2.7
2ØC <sub>11</sub>	0.81	1.2082	2.0	6.7
3ØC <sub>11</sub>	0.73	2.4292	0.9	3.0
4ØC <sub>11</sub>	1.32	3.0444	1.3	4.3
5+6ØC <sub>11</sub>	3.72	3.1020	3.6	12.0
2ØC <sub>12</sub>	1.68	2.0196	2.5	8.3
3ØC <sub>12</sub>	2.03	2.6516	2.3	7.7
4ØC <sub>12</sub>	0.77	3.3055	0.7	2.3
5+6ØC <sub>12</sub>	2.83	3.2697	2.6	8.7
2ØC <sub>13</sub>	1.20	1.8053	2.0	6.7
3ØC <sub>13</sub>	1.41	2.6445	1.6	5.3
4ØC <sub>13</sub>	3.89	3.2453	3.6	12.0
5+6+7ØC <sub>13</sub>	6.21	3.5831	5.2	17.3

\* S<sub>0</sub>: desviación estándar obtenida para las siete disoluciones de blanco

#### 4.4 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la *Tablas 3.26* y *3.27* se muestran los valores obtenidos tanto para los homólogos como para los isómeros del LAS, respectivamente. En estas tablas se presentan el Rango Dinámico Lineal (*RDL*), la linealidad (*LIN*), la Desviación Estándar Relativa (*DER*) y la sensibilidad analítica (*S<sub>analítica</sub>*).

*Tabla 3.26 - Parámetros estudiados para cada uno de los homólogos de LAS*

Homólogos de LAS	RDL (mg·L <sup>-1</sup> )	LIN (%)	DER (%)	S <sub>analítica</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )
C <sub>10</sub>	0.0053 - 0.5656	98.719	3.5	3.0
C <sub>11</sub>	0.0130 - 1.3088	98.851	0.8	9.2
C <sub>12</sub>	0.0107 - 1.1896	98.431	3.9	6.4
C <sub>13</sub>	0.0087 - 0.9360	97.549	5.7	6.8

*Tabla 3.27 - Parámetros estudiados para cada uno de los isómeros de LAS*

Isómeros de LAS	RDL (μg·L <sup>-1</sup> )	LIN (%)	DER (%)	S <sub>analítica</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )
2ØC <sub>10</sub>	4.0 - 106.4	98.521	4.3	1.8
3ØC <sub>10</sub>	3.7 - 117.6	98.435	2.5	2.2
4ØC <sub>10</sub>	6.3 - 1452.0	98.624	2.6	2.3
5ØC <sub>10</sub>	2.7 - 196.4	98.572	3.0	1.6
2ØC <sub>11</sub>	6.7 - 201.6	98.846	5.4	3.5
3ØC <sub>11</sub>	3.0 - 226.8	98.699	2.5	1.8
4ØC <sub>11</sub>	4.3 - 289.2	98.806	2.8	3.5
5+6ØC <sub>11</sub>	12.0 - 591.2	98.805	2.7	7.2
2ØC <sub>12</sub>	8.3 - 156.8	97.647	8.1	5.0
3ØC <sub>12</sub>	7.7 - 186.0	97.979	2.0	5.8
4ØC <sub>12</sub>	2.3 - 231.6	98.135	3.1	2.0
5+6ØC <sub>12</sub>	8.7 - 615.2	98.221	4.5	7.3
2ØC <sub>13</sub>	6.7 - 110.8	96.703	3.2	4.7
3ØC <sub>13</sub>	5.3 - 127.6	96.772	5.7	3.4
4ØC <sub>13</sub>	12.0 - 162.4	96.760	3.4	5.9
5+ 6+7ØC <sub>13</sub>	17.3 - 535.2	97.292	3.2	11.8

Cuanto a la linealidad, calculada como linealidad “*on-line*”, según los datos obtenidos para cada uno de los componentes de la mezcla comercial del LAS, los valores encontrados fueron los que se representan en las **Tablas 3.26** y **3.27**.

En todos los casos la linealidad es superior al 95%. Se puede, por tanto, afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

#### **4.5 - Precisión**

Para evaluar este parámetro, se trataron tres disoluciones de LAS de 5.00 mg·L<sup>-1</sup> de concentración final. Para cada punto experimental se realizó tres réplicas instrumentales. Las determinaciones fueron realizadas en el mismo día estipulando así, la repetibilidad del método. Las disoluciones fueron tratadas mediante el procedimiento de Extracción en Fase Sólida ya descrito con anterioridad e inyectadas en el cromatógrafo de líquidos fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tablas 3.26** y **3.27**.

Se observa que, en todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10% y se puede concluir que el método propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumple con los requisitos de precisión.

#### **4.6 - Sensibilidad o Resolución analítica**

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se expresan las **Tablas 3.26** y **3.27**.

### **5 - VALIDACIÓN**

El método analítico propuesto para la determinación de homólogos e

isómeros de LAS por cromatografía líquida con detección fluorescente fue aplicado a muestras de agua residual y de pozo procedentes de la zona no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada situada a 5 Km de esta ciudad. La metodología empleada para este fin fue la adición de patrón. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibración diferentes:

⇒ **Calibrado con patrones (CP).**

⇒ **Calibrado con adición de patrón a muestra (CA).**

⇒ **Calibrado de Youden** con volúmenes crecientes muestra dopada (CY).

### **5.1 - Calibrado con patrones (CP)**

Primeramente, se realizó el calibrado con patrones. En el apartado anterior se describió el desarrollo de este calibrado para los compuestos objeto de estudio en agua Milli-Q, obteniéndose sus correspondientes parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón, se empleó la ordenada en el origen ( $a$ ), la pendiente ( $b$ ) y la desviación estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ), valores que se recogen en la tabla de validación correspondiente a cada compuesto.

### **5.2 - Calibrado con adición de patrón (CA)**

Posteriormente, se estableció el calibrado con adición de patrón. Para ello,



en una serie de matraces aforados de 25 mL, se introdujeron 12.5 mL de agua residual urbana o de pozo, según proceda. A continuación se adicionaron volúmenes crecientes de una disolución patrón de LAS a 10 mg·L<sup>-1</sup> de concentración, y se enrasó con agua Milli-Q hasta el volumen final, para obtener concentraciones de analito comprendidas entre 0.00 y 4.00 mg·L<sup>-1</sup>.

Las disoluciones así preparadas fueron extraídas siguiendo el procedimiento operatorio descrito anteriormente y, finalmente, se inyectó en el cromatógrafo de líquidos fijando las condiciones instrumentales habituales.

### **5.3 - Calibrado de Youden (CY)**

Finalmente se estableció el calibrado de Youden. Para ello, en matraces aforados de 25 mL, se introdujeron volúmenes crecientes de agua residual y de pozo y se enrasaron con agua Milli-Q hasta el volumen final. Tanto el agua residual como del pozo estaban dopadas con un nivel de 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de LAS total. Los volúmenes de agua residual o de pozo empleados fueron 2.50; 6.25; 12.50; 25.00 mL. Las disoluciones se extrajeron e inyectaron en el cromatógrafo de líquidos siguiendo el procedimiento habitual.

### **5.4 - Comprobación de la veracidad del método**

Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos en las muestras de agua residual urbana y de pozo son representados a continuación.

Tabla 3.28 - Validación del método para determinación del homólogo  $C_{10}$  de LAS

$C_{10}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	16.2	820.4	-0.7	16.2	191.6	2.5
<b>b</b>	818.9	872.5	-	818.9	818.7	-
$S_{y/x}$	2.5	24.6	13.0	2.5	3.0	2.0
$S_p$	17.8		-	7.8		-
$t_{cal. (b)}$	1.981 (P = 8.8%)		-	0.023 (P = 98.2%)		-
$b_p$	844.8		-	818.8		-
$a'$	5.8	831.2	-	16.2	191.6	-
$a_y$	-	-	-0.7	-	-	2.5
$C_x$	0.989	0.985	-	0.228	0.231	-
$t_{cal. (c)}$	0.319 (P = 75.7%)		-	2.306 (P = 68.2%)		-

Tabla 3.29 - Validación del método para determinación del homólogo  $C_{11}$  de LAS

$C_{11}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	53.8	2438.9	33.3	53.8	630.1	11.9
<b>b</b>	810.3	831.4	-	810.3	805.7	-
$S_{y/x}$	7.5	64.0	44.5	7.5	3.9	16.5
$S_p$	47.8		-	23.1		-
$t_{cal. (b)}$	0.999 (P = 35.1%)		-	0.449 (P = 66.7%)		-
$b_p$	820.5		-	808.1		-
$a'$	39.7	2453.5	-	56.8	626.9	-
$a_y$	-	-	33.3	-	-	11.9
$C_x$	2.948	2.950	-	0.759	0.761	-
$t_{cal. (c)}$	0.037 (P = 97.1%)		-	0.107 (P = 91.8%)		-

Tabla 3.30 - Validación del método para determinación del homólogo C<sub>12</sub> de LAS

C <sub>12</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	28.5	1781.3	20.3	28.5	456.3	24.5
<b>b</b>	773.2	791.9	-	773.2	747.5	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	5.0	53.8	8.3	5.0	3.3	27.4
<b>S<sub>p</sub></b>	42.9		-	24.7		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	0.812 (P = 44.3%)		-	1.935 (P = 9.4%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	782.2		-	760.8		-
<b>a'</b>	18.3	1792.0	-	42.6	441.7	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	20.3	-	-	24.5
<b>C<sub>x</sub></b>	2.222	2.265	-	0.562	0.548	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	1.298 (P = 23.1%)		-	0.701 (P = 50.3%)		-

Tabla 3.31 - Validación del método para determinación del homólogo C<sub>13</sub> de LAS

C <sub>13</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	-0.2	924.3	21.2	-0.2	230.5	10.7
<b>b</b>	719.7	715.1	-	719.7	662.6	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	4.9	19.5	6.2	4.9	8.8	13.4
<b>S<sub>p</sub></b>	25.1		-	22.4		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	0.206 (P = 84.2%)		-	2.874 (P = 8.4%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	717.4		-	692.1		-
<b>a'</b>	1.4	922.7	-	18.8	210.9	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	21.2	-	-	10.7
<b>C<sub>x</sub></b>	1.245	1.257	-	0.328	0.289	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	0.565 (P = 58.8%)		-	2.002 (P = 8.0%)		-

**Tabla 3.32** - Validación del método para determinación del isómero  $2\text{Ø}C_{10}$  de LAS

$2\text{Ø}C_{10}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	6.0	339.7	3.0	6.0	85.9	3.2
<b>b</b>	1602.8	1596.3	-	1602.8	1669.8	-
$S_{y/x}$	2.9	11.2	3.6	2.9	3.8	1.0
$S_p$	69.6		-	22.1		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.092 (P = 92.9%)		-	1.681 (P = 13.7%)		-
$b_p$	1616.9		-	1668.0		-
$a'$	6.1	337.8	-	2.4	86.1	-
$a_y$	-	-	3.0	-	-	3.2
$C_x$	0.210	0.208	-	0.050	0.050	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.831 (P = 43.0%)		-	0.17 (P = 87.0%)		-

**Tabla 3.33** - Validación del método para determinación del isómero  $3\text{Ø}C_{10}$  de LAS

$3\text{Ø}C_{10}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	8.3	461.4	7.4	8.3	99.2	3.8
<b>b</b>	1894.6	1843.2	-	1894.6	1991.1	-
$S_{y/x}$	4.2	14.8	3.7	4.2	3.7	1.2
$S_p$	10.9		-	5.6		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.562 (P = 59.1%)		-	2.059 (P = 7.9%)		-
$b_p$	1882.5		-	1985.3		-
$a'$	10.6	457.8	-	3.0	99.7	-
$a_y$	-	-	7.4	-	-	3.8
$C_x$	0.240	0.239	-	0.048	0.048	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.270 (P = 79.4%)		-	0.383 (P = 7.2%)		-

**Tabla 3.34** - Validación del método para determinación del isómero 4ØC<sub>10</sub> de LAS

4ØC <sub>10</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	14.3	688.1	6.4	14.3	132.3	5.0
<b>b</b>	2564.1	2524.9	-	2564.1	2704.6	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	5.9	21.4	7.6	5.9	5.4	1.4
<b>S<sub>p</sub></b>	15.2		-	6.8		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	0.303 (P = 77.1%)		-	2.419 (P = 4.6%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	2559.4		-	2683.0		-
<b>a´</b>	15.9	685.0	-	7.2	134.2	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	6.4	-	-	5.0
<b>C<sub>x</sub></b>	0.267	0.265	-	0.046	0.048	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	0.389 (P = 77.7%)		-	1.145 (P = 28.5%)		-

**Tabla 3.35** - Validación del método para determinación del isómero 5ØC<sub>10</sub> de LAS

5ØC <sub>10</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	9.4	714.9	0.6	9.4	130.6	4.4
<b>b</b>	1943.9	1873.9	-	1943.9	2052.1	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	3.1	20.7	0.9	3.1	6.8	1.4
<b>S<sub>p</sub></b>	14.8		-	7.5		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	0.716 (P = 49.7%)		-	2.192 (P = 6.5%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	1917.4		-	2041.3		-
<b>a´</b>	13.5	709.8	-	2.015	131.8	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	0.6	-	-	4.4
<b>C<sub>x</sub></b>	0.372	0.370	-	0.060	0.062	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	0.535 (P = 60.7%)		-	1.162 (P = 27.9%)		-

**Tabla 3.36** - Validación del método para determinación del isómero  $2\text{Ø}C_{11}$  de LAS

$2\text{Ø}C_{11}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	11.4	556.1	5.7	11.4	167.3	11.4
<b>b</b>	1205.6	1212.9	-	1205.6	1202.0	-
$S_{y/x}$	4.2	26.0	2.9	4.2	6.1	7.0
$S_p$	18.2		-	7.7		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.131 (P = 90.0%)		-	0.157 (P = 88.0%)		-
$b_p$	1215.9		-	1208.3		-
$a'$	10.2	555.3	-	11.7	165.7	-
$a_y$	-	-	5.7	-	-	11.4
$C_x$	0.458	0.452	-	0.135	0.128	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.647 (P = 53.6%)		-	0.157 (P = 8.6%)		-

**Tabla 3.37** - Validación del método para determinación del isómero  $3\text{Ø}C_{11}$  de LAS

$3\text{Ø}C_{11}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	34.3	1385.8	13.8	34.3	364.2	17.4
<b>b</b>	2429.2	2442.0	-	2429.2	2455.3	-
$S_{y/x}$	4.4	57.3	10.1	4.4	11.6	9.9
$S_p$	40.6		-	17.2		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.108 (P = 91.7%)		-	0.520 (P = 61.9%)		-
$b_p$	2458.6		-	2467.8		-
$a'$	31.7	1381.5	-	29.7	361.0	-
$a_y$	-	-	13.8	-	-	17.4
$C_x$	0.565	0.556	-	0.146	0.139	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.846 (P = 42.2%)		-	1.707 (P = 12.6%)		-

**Tabla 3.38** - Validación del método para determinación del isómero 4ØC<sub>11</sub> de LAS

4ØC <sub>11</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	44.3	1970.5	13.5	44.3	469.6	20.0
<b>b</b>	3044.5	3028.6	-	3044.5	3082.5	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	10.7	72.3	9.9	10.7	16.1	11.3
<b>S<sub>p</sub></b>	50.7		-	21.1		-
<b>t cal. (b)</b>	0.110 (P = 91.5%)		-	0.634 (P = 54.6%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	3058.3		-	3095.6		-
<b>a´</b>	47.3	1962.2	-	39.3	466.0	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	13.5	-	-	20.0
<b>C<sub>x</sub></b>	0.647	0.637	-	0.152	0.144	-
<b>t cal. (c)</b>	0.954 (P = 36.8%)		-	1.929 (P = 9.0%)		-

**Tabla 3.39** - Validación del método para determinación de los isómeros 5+6ØC<sub>11</sub> de LAS

5+6ØC <sub>11</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	74.1	4565.0	33.8	74.1	972.3	37.2
<b>b</b>	3101.9	3058.2	-	3101.9	3114.9	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	22.3	155.0	31.6	22.3	31.5	19.2
<b>S<sub>p</sub></b>	108.3		-	43.1		-
<b>t cal. (b)</b>	0.290 (P = 78.0%)		-	0.216 (P = 83.5%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	3097.5		-	3136.9		-
<b>a´</b>	85.3	4543.3	-	68.0	960.1	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	33.8	-	-	37.2
<b>C<sub>x</sub></b>	1.478	1.456	-	0.310	0.294	-
<b>t cal. (c)</b>	1.059 (P = 32.0%)		-	1.945 (P = 8.7%)		-

**Tabla 3.40** - Validación del método para determinación del isómero  $2\text{Ø}C_{12}$  de LAS

$2\text{Ø}C_{12}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	17.4	615.8	13.6	17.4	184.4	16.1
<b>b</b>	2019.6	2071.3	-	2019.6	1987.1	-
$S_{y/x}$	10.1	29.9	1.2	10.1	8.7	12.6
$S_p$	25.2		-	16.8		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.478 (P = 64.8%)		-	0.450 (P = 66.6%)		-
$b_p$	2061.7		-	2003.1		-
$a'$	12.1	617.5		20.4	181.5	-
$a_y$	-	-	13.6	-	-	16.1
$C_x$	0.287	0.293	-	0.089	0.083	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.779 (P = 45.9%)		-	1.168 (P = 27.7%)		-

**Tabla 3.41** - Validación del método para determinación del isómero  $3\text{Ø}C_{12}$  de LAS

$3\text{Ø}C_{12}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	22.9	971.7	15.3	22.9	258.1	23.8
<b>b</b>	2650.4	2792.6	-	2650.4	2638.8	-
$S_{y/x}$	15.4	46.9	2.6	15.4	10.6	19.2
$S_p$	35.8		-	19.7		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.956 (P = 37.1%)		-	0.141 (P = 89.2%)		-
$b_p$	2757.6		-	2650.7		-
$a'$	8.1	978.2		23.9	255.9	-
$a_y$	-	-	15.3	-	-	23.8
$C_x$	0.343	0.349	-	0.093	0.088	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.771 (P = 46.3%)		-	1.174 (P = 27.4%)		-



**Tabla 3.42** - Validación del método para determinación del isómero 4ØC<sub>12</sub> de LAS

4ØC <sub>12</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	34.3	1382.1	15.3	34.3	345.0	30.6
<b>b</b>	3305.4	3501.0	-	3305.4	3317.3	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	6.6	61.8	4.6	6.6	12.7	22.9
<b>S<sub>p</sub></b>	46.0		-	23.5		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	1.058 (P = 32.51%)		-	0.126 (P = 90.3%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	3453.6		-	3325.9		-
<b>a´</b>	13.2	1391.2	-	32.7	343.4	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	15.3	-	-	30.6
<b>C<sub>x</sub></b>	0.394	0.398	-	0.100	0.094	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	0.589 (P = 57.2%)		-	1.286 (P = 23.4%)		-

**Tabla 3.43** - Validación del método para determinación de los isómeros 5+6ØC<sub>12</sub> de LAS

5+6ØC <sub>12</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	97.4	4198.6	54.1	97.4	970.3	75.1
<b>b</b>	3269.7	3350.2	-	3269.7	3078.1	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	23.9	158.4	13.5	23.9	60.2	54.7
<b>S<sub>p</sub></b>	119.4		-	71.0		-
<b>t<sub>cal. (b)</sub></b>	0.477 (P = 64.8%)		-	1.910 (P = 9.8%)		-
<b>b<sub>p</sub></b>	3339.9		-	3152.4		-
<b>a´</b>	72.0	4204.1	-	153.2	928.0	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	54.1	-	-	75.1
<b>C<sub>x</sub></b>	1.238	1.243	-	0.301	0.271	-
<b>t<sub>cal. (c)</sub></b>	0.197 (P = 84.9%)		-	2.236 (P = 5.6%)		-

**Tabla 3.44** - Validación del método para determinación del isómero  $2\text{Ø}C_{13}$  de LAS

$2\text{Ø}C_{13}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	6.2	265.4	11.9	6.2	68.7	6.2
<b>b</b>	1805.3	1731.9	-	1805.3	1709.9	-
$S_{y/x}$	8.5	11.3	1.4	8.5	3.6	3.1
$S_p$	11.8		-	9.6		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.672 (P = 52.3%)		-	1.082 (P = 31.5%)		-
$b_p$	1752.0		-	1736.7		-
$a'$	9.6	263.7	-	10.6	66.5	-
$a_y$	-	-	11.9	-	-	6.2
$C_x$	0.146	0.144	-	0.038	0.035	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.663 (P = 52.6%)		-	1.137 (P = 28.9%)		-

**Tabla 3.45** - Validación del método para determinación del isómero  $3\text{Ø}C_{13}$  de LAS

$3\text{Ø}C_{13}$						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	4.4	489.3	21.4	4.4	122.4	14.4
<b>b</b>	2644.5	2716.2	-	2644.5	2574.3	-
$S_{y/x}$	9.0	18.8	2.9	9.0	10.2	7.8
$S_p$	19.8		-	16.8		-
$t_{\text{cal. (b)}}$	0.459 (P = 66.0%)		-	0.528 (P = 61.4%)		-
$b_p$	2685.4		-	2586.8		-
$a'$	0.7	492.3	-	8.3	121.1	-
$a_y$	-	-	21.4	-	-	14.4
$C_x$	0.173	0.175	-	0.046	0.041	-
$t_{\text{cal. (c)}}$	0.435 (P = 67.5%)		-	1.237 (P = 25.1%)		-

**Tabla 3.46** - Validación del método para determinación del isómero 4ØC<sub>13</sub> de LAS

4ØC <sub>13</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	5.2	699.7	20.0	5.2	163.1	17.1
<b>b</b>	3245.3	3381.9	-	3245.3	3208.1	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	19.2	29.8	0.4	19.2	12.6	11.2
<b>S<sub>p</sub></b>	28.5	-	-	22.3	-	-
<b>t cal. (b)</b>	0.660 (P = 53.0%)	-	-	0.229 (P = 82.5%)	-	-
<b>b<sub>p</sub></b>	3032.5	-	-	2911.7	-	-
<b>a´</b>	-44.3	736.7	-	-34.2	194.5	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	20.0	-	-	17.1
<b>C<sub>x</sub></b>	0.224	0.236	-	0.055	0.061	-
<b>t cal. (c)</b>	2.120 (P = 6.7%)	-	-	1.293 (P = 23.2%)	-	-

**Tabla 3.47** - Validación del método para determinación de los isómeros 5+6+7ØC<sub>13</sub> de LAS

5+6+7ØC <sub>13</sub>						
	Residual			Pozo		
	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>a</b>	47.6	2872.7	77.2	47.6	637.2	63.0
<b>b</b>	3583.1	3456.1	-	3583.1	3216.5	-
<b>S<sub>y/x</sub></b>	42.3	99.7	14.4	42.3	47.8	44.5
<b>S<sub>p</sub></b>	94.6	-	-	75.3	-	-
<b>t cal. (b)</b>	0.661 (P = 53.0%)	-	-	2.398 (P = 7.5%)	-	-
<b>b<sub>p</sub></b>	3490.9	-	-	3324.3	-	-
<b>a´</b>	74.4	2859.5	-	124.6	596.4	-
<b>a<sub>y</sub></b>	-	-	77.2	-	-	63.0
<b>C<sub>x</sub></b>	0.803	0.797	-	0.189	0.160	-
<b>t cal. (c)</b>	0.346 (P = 73.8%)	-	-	2.046 (P = 7.5%)	-	-

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que:

⇒ En la comparación de las pendientes de ambos calibrados, se observa que no hay diferencia significativa, o sea, se concluye por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), por tanto las pendientes son iguales.

⇒ En todos los casos el valor de  $a_{CY}$  estaba incluido en el intervalo calculado para  $a'_{CP}$ .

⇒ Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $C_{CP}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $C_{CA}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), que no había diferencia significativa entre ambos.

Se puede afirmar por tanto que el método propuesto es exacto para todos los analitos con un nivel de significación mayor del 5%. Asimismo, el método queda validado para la determinación de homólogos y de isómeros de LAS en agua residual urbana y de pozo.

---

---

**CAPÍTULO 4**  
**DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS SÓLIDAS**

---

---



## 1 - INTRODUCCIÓN

En el presente Capítulo se propone la determinación de *LAS* en una matriz medioambiental como el suelo agrícola.

En el apartado inicial se comenta el desarrollo y los diferentes aspectos involucrados en la metodología analítica para determinar estos analitos en suelos. Inicialmente, se comenta la modificación de la etapa de separación cromatográfica seguida de las optimizaciones realizadas en las etapas anteriores (Extracción en Fase Sólida y Extracción Asistida por el ultrasonido). Como consecuencia, fue realizada una colecta en varios puntos de la Vega de Granada con la finalidad de aplicar la metodología desarrollada y para evaluar la presencia de estos analitos en esta zona.

## 2 - METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS EN MUESTRAS DE SUELOS

El objetivo es establecer la metodología analítica necesaria para determinar los homólogos e isómeros del *LAS* en muestras de suelo. Para esta finalidad fueron necesarias las siguientes etapas:

- 1) Extracción por Ultrasonido.
- 2) Purificación y preconcentración mediante Extracción en Fase Sólida.
- 3) Separación y detección por *HPLC/FLD*.

Aunque en el protocolo del análisis se sigue el orden anteriormente indicado, para la optimización de las distintas variables químicas e instrumentales, éste fue modificado. Así, se comenzó por la optimización de la separación cromatográfica con una modificación frente a la separación ya desarrollada en el Capítulo anterior, seguido por la purificación del extracto y preconcentración de los analitos y, concluyendo con la optimización de las condiciones de la extracción asistida por ultrasonido.

### 2.1 - Aspectos cromatográficos

Se ha empleado el método cromatográfico descrito en el Capítulo anterior con la única modificación de introducir un patrón interno.

Este procedimiento es empleado muy a menudo principalmente en espectrometría de emisión atómica y en cromatografía de gases, y es de gran utilidad en los casos en que la señal depende de factores poco reproducibles y que pueden variar en el curso del análisis, ya que aunque las señales de ambas sustancias se vean afectadas, el cociente permanece constante.

Se considera patrón interno a una sustancia que no está presente en la muestra, cuyo comportamiento es similar al del analito y que no interfiere en la determinación, por tanto, se empleó una sal sódica de un isómero del LAS que no está presente en la composición comercial que lleva esta sustancia y tampoco en la matriz a estudiar. La sustancia seleccionada fue el isómero 2ØC<sub>8</sub>.

Se comprobó que el patrón interno no se solapaba con ningún homólogo



y, por ende, a ningún isómero del LAS pues presentaba un tiempo de retención mucho más corto que estas especies.

## **2.2 - Aspectos sobre la purificación del extracto y preconcentración de los analitos**

Evidentemente, esta etapa presentaba una gran dificultad ya que se trataba de originar un extracto que pudiera ser procesado sin originar ningún inconveniente como la precipitación del analito con algún reactivo, la reacción de analito (dada su peculiaridad de ser un tensioactivo) con alguna superficie; y que presentara una adecuada pureza química que le permitiese ser posteriormente separado por cromatografía líquida, es decir, que no hubiesen picos coextraídos que pudiesen solapar con los componentes del LAS.

Esta etapa de purificación consta de dos fases distintas:

- a) Una etapa física en la que se eliminan los sólidos en suspensión, estudiando dos técnicas para esta finalidad: la filtración y la centrifugación.
- b) Una etapa química que consiste en la separación de los componentes del LAS de los demás compuestos coextraídos que podrían interferir en su determinación, empleando para esto la Extracción en Fase Sólida.

### **2.2.1 - Etapa de purificación física**

#### **A) Filtración**

Una vez realizado la extracción asistida por el ultrasonido se obtiene una

suspensión donde se encuentran dos fases: una fase líquida que contiene los analitos de interés y todas las demás sustancias que fueron coextraídas, y, una fase sólida, la matriz (suelo). Antes de proceder la Extracción en Fase Sólida es necesaria la separación de estas fases.

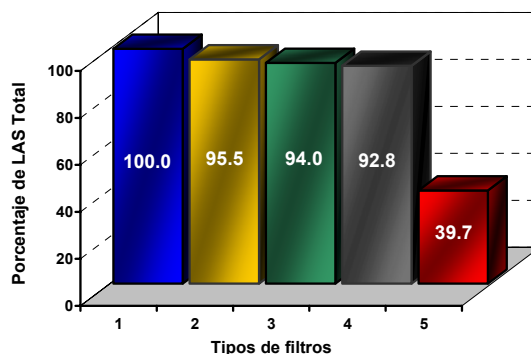
En primer lugar, se eligió el uso de la filtración. Para ello se utilizaron los siguientes tipos de membranas de filtración:

- Acetato de celulosa (papel de filtro).
- Fibra de vidrio.
- Acetato de celulosa + Fibra de vidrio.
- Nylon.

Para realizar este estudio, se siguió el siguiente procedimiento: fueron preparados 10 matraces con una disolución acuosa de  $15.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total en cada uno de ellos. Fue utilizado agua como disolvente pues con el agua se garantizaba su inercia en relación con las membranas utilizadas. Se hacen pasar a través de los filtros anteriormente mencionados a un flujo de  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mediante la cámara de vacío múltiple (“*Vacuum Manifold*”).

Este estudio se realiza por duplicado y los resultados se comparan con los obtenidos cuando la disolución no se hace pasar por los filtros.

La cuantificación del LAS fue realizada usando la metodología cromatográfica descrita anteriormente. Los valores obtenidos fueron expresados como LAS total y como resultado del promedio de los experimentos. Los valores encontrados se muestran en siguiente figura.



**Figura 4.1** - 1) sin filtrar; 2) Acetato de celulosa; 3) Fibra de vidrio; 4) Acetato de celulosa + Fibra de vidrio; 5) Nylon

Por medio de este experimento se pudo comprobar que la técnica de filtración no resultó ser la más adecuada ya que el analito en cuestión (*LAS* total) sufre pérdidas durante esta etapa, sobretudo con los componentes más apolares, como es el caso de la serie homóloga  $C_{13}$ . Incluso se pudo comprobar experimentalmente que con la utilización de membranas de Nylon, prácticamente todo el homólogo  $C_{13}$  empleado ( $\sim 96\%$ ) se quedaba retenido en este tipo de filtro. Esta reducción de la cantidad encontrada de *LAS* total está relacionada con su capacidad de adsorción.

También se probó una membrana de filtración compuesta por el polímero Difluoruro de Polivinilidina (*PVDF*), considerado un polímero altamente no reactivo. En pruebas previas realizadas en las mismas condiciones que en los casos anteriores se comprobó que el *LAS* prácticamente no se retenía. El siguiente paso es comprobar la influencia de la concentración sobre la retención. Para esto, se prepararon 12 matraces en series de tres, conteniendo cuatro concentraciones diferentes: 1.0; 5.0; 20.0; 50.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* total. Dos matraces de cada concentración se hacen pasar por el

filtro mientras que el otro se utiliza como referencia (sin filtrar). Los resultados son expresados en valores relativos (%) en la siguiente tabla.

**Tabla 4.1** - Resultados tras el proceso de filtración con membrana PVDF

	C <sub>10</sub> (%)	C <sub>11</sub> (%)	C <sub>12</sub> (%)	C <sub>13</sub> (%)	Media (%)
1.0 mg·L <sup>-1</sup>	99.6	99.1	98.9	98.2	99.0
5.0 mg·L <sup>-1</sup>	99.7	98.8	98.5	98.1	98.8
20.0 mg·L <sup>-1</sup>	99.5	98.8	98.1	98.0	98.6
50.0 mg·L <sup>-1</sup>	99.3	98.4	98.2	97.9	98.5

Con este experimento se pudo concluir que esta membrana de filtración no retenía los analitos. Pero presentaba dos inconvenientes: a) es cierto que no retenía LAS pero tenía un uso limitado puesto que presentaba un tamaño de poro que variaba de 0.45 - 0.22  $\mu\text{m}$ , hecho que comprometía la filtración trabajando con una suspensión (extracto proveniente de la extracción del LAS por el ultrasonido más el suelo), ralentizando mucho esta etapa o, incluso, imposibilitándola siendo, en todo caso, más indicada para filtrar muestras líquidas (aguas residuales, de pozo); b) su elevado coste de adquisición (136 € por cada 100 unidades).

## **B) Centrifugación**

Por estas razones se decidió emplear la centrifugación como herramienta para eliminar la fracción sólida después del proceso de extracción asistida por el ultrasonido.

Se ha optimizado tanto el tiempo como la velocidad de centrifugación con objeto de minimizar la duración del tratamiento físico.

Primeramente, para establecer la velocidad de centrifugación, se prepararon 8 tubos de centrifugación con capacidad volumétrica de 100 mL, añadiéndoles 50 mL de una suspensión conteniendo suelo (5 gramos) y agua Milli-Q. Se ensayaron 1000; 2000; 3000 y 4000 revoluciones por minutos (rpm), con un tiempo de 15 minutos. Los experimentos se hicieron por duplicado.

Con una velocidad de centrifugación de 4000 rpm se obtiene una separación total de fases, con un sobrenadante limpio y exento de partículas. Las demás presentaban cierta turbidez, en menor o en mayor grado, de acuerdo con la centrifugación realizada.

Para optimizar el tiempo de centrifugación, se prepararon igualmente tubos de centrifugación con 50 mL de una suspensión conteniendo suelo (5 gramos) y agua Milli-Q. Los tiempos de centrifugación ensayados fueron de 5; 10; 15 y 20 minutos a 4000 rpm. Los experimentos se realizaron por duplicado.

De los experimentos realizados, el único que presentó cierta turbidez fue el que había sido centrifugado a 5 minutos. Todos los demás presentaban una separación total de las fases. En base a estos resultados, se seleccionó un tiempo de 10 minutos.

Sucintamente, basados en estos resultados, los parámetros para promover la etapa de purificación física están evidenciados en la **Tabla 4.2**.

**Tabla 4.2 - Parámetros de centrifugación**

Parámetros de Centrifugación	
Tiempo	10 minutos
Velocidad	4000 rpm

### 2.2.2 - Etapa de purificación química

Una vez obtenido un extracto libre de partículas, se procedió a la Extracción en Fase Sólida (*SPE*) con objeto de eliminar las sustancias coextraídas con el *LAS* del suelo en el proceso de extracción asistida por el ultrasonido y para proporcionar la preconcentración de los analitos. Debido a que la composición química bastante compleja y heterogénea, son necesarias dos etapas de *SPE*, empleando para tal fin, dos tipos de adsorbentes distintos (*SAX* y  $C_{18}$ ) pero que actuarían de forma complementaria.

En la primera etapa, se lleva a cabo una Extracción en Fase Sólida utilizando como relleno una resina intercambiadora aniónica fuerte compuesta por una sal de amonio cuaternario (*SAX*), capaz de retener especies aniónicas con la consiguiente eliminación de todas aquellas sustancias coextraídas que no posean grupos aniónicos en su molécula. El *LAS* se retiene a través de su grupo sulfonato.

Posteriormente, fue necesario la utilización de un cartucho con fase sólida apolar ( $C_{18}$ ) capaz de retener las sustancias con carácter apolar o que contengan en su molécula una parte apolar como es el caso del *LAS* debido a su cadena alquílica y grupo fenilo. Por tanto, en esta etapa se

elimina todas aquellas sustancias que aún cumpliendo con la primera premisa (especies aniónicas) no cumplen con la segunda (carácter apolar).

Para realizar este proceso también se hizo uso de una cámara de vacío que posee una serie de canales mediante los cuales se controla el flujo del proceso de extracción.

### 2.2.2.1 - Extracción en Fase Sólida con cartuchos SAX

La *SPE* empleada consta de cinco etapas:

1) Activación: Se utiliza un disolvente orgánico para “humidificar” la fase sólida. Como en este caso se utilizó un cartucho conteniendo una fase estacionaria polar (*SAX*), el disolvente usado para activarla fue n-Hexano.

2) Acondicionamiento: La fase estacionaria de *SPE* fue acondicionada con el mismo disolvente empleado para la extracción del analito de la matriz (metanol). Esta etapa permite "alinearse" la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo una mayor y mejor interacción entre los analitos y la fase estacionaria. Cualquier disolvente orgánico residual se elimina en esta etapa, asegurando que los componentes de interés sean retenidos en la parte superior de la columna.

3) Carga: En esta etapa, las interacciones entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el relleno de los cartuchos de la *SPE*. Para maximizar las interacciones de la muestra (compuesta de analitos e interferentes coextraídos de la matriz) se debe controlar el caudal de carga. Esto puede ser hecho mediante un control

de una válvula en la cámara de vacío. Los componentes de interés se retienen por procesos de intercambio iónico en el relleno del cartucho mientras que los demás componentes de la matriz y contaminantes se eluyen.

4) Lavado: Utilizado para eliminar interferencias. Con tal fin, se emplea un disolvente o una serie de disolventes de fuerza creciente haciendo que los contaminantes puedan eliminarse del relleno hasta que exclusivamente los analitos de interés queden atrapados. En este caso sólo fue necesario el uso del metanol.

5) Elución: La elución de los analitos se efectúa haciendo pasar por el relleno un eluyente a un caudal adecuado. El relleno del cartucho de *SPE* y las interacciones analito-rellenos determinan el eluyente final de elución. En los casos en los que se trabaja con rellenos de intercambio aniónico, se suele emplear como eluyente disoluciones de un ácido fuerte como es el caso del ácido clorhídrico pues los aniones  $\text{Cl}^-$  funcionan desplazando el grupo sulfonato del *LAS* de los sitios activos de unión con la fase estacionaria.

Hay que resaltar que, después de cada activación, el cartucho debería ser secado totalmente para que no se mezclase el n-Hexano con el metanol (MetOH) y dificultase los pasos siguientes. Por otra parte también se debería evitar que en las etapas de acondicionamiento, carga y lavado se secase el cartucho porque podría acarrear pérdidas del analito.

Las condiciones empleadas son las que se muestran en la siguiente tabla.



**Tabla 4.3 - Esquema de la etapa usando SAX de la SPE**

<b>Condiciones de Extracción en Fase Sólida (etapa SAX)</b>	
<b>Activación</b>	3.0 mL de n-Hexano
<b>Acondicionamiento</b>	5.0 mL de MetOH
<b>Carga*</b>	x mL de Extracto Metanólico
<b>Lavado</b>	5.0 mL de MetOH
<b>Elución</b>	2.0 mL de HCl de 4.0 M (Moralidad)

\* Variables que se optimizaron posteriormente

La elución se lleva a cabo en matraces de 10 mL, a los que se les añade posteriormente 2 gotas de fenolftaleína, se neutraliza con disolución 4.0 M de NaOH y se enrase con agua Milli-Q. Esta disolución es la que se utiliza en la siguiente etapa de Extracción en Fase Sólida (C<sub>18</sub>) para cargar el cartucho.

Con la finalidad de perfeccionar esta etapa, se verificó en qué grado se podría alterar la cantidad del analito eluído optimizando los dos parámetros: el flujo y la concentración del HCl para la elución.

#### **A) Flujo**

Se evaluó la influencia del flujo sobre las diferentes etapas de Extracción en Fase Sólida, salvo en la elución. Se estudiaron cuatro flujos (1.0; 2.0; 4.0 y > 4.0 mL·min<sup>-1</sup>) con disoluciones metanólicas de 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de LAS total y llevando a cabo la elución con un disolución de HCl a 1.0 M.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.4**.

**Tabla 4.4** - Influencia del flujo en la SPE (SAX)

Flujo ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	LAS total (%)
1.0	97.2
2.0	96.5
4.0	96.1
> 4.0	88.7

El valor óptimo alcanzado (flujo de  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) resultaba en un consumo excesivo de tiempo. Debido a esto y a que se obtenían buenas recuperaciones con flujos más elevados (de  $2.0$  hasta  $4.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), se optó para los experimentos posteriores por el empleo de un flujo comprendido entre  $2.0 - 3.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cabe resaltar que el flujo empleado para la elución fue por gravedad sin utilización de vacío, ya que producía mejores resultados.

#### **B) Concentración de HCl en la elución**

A continuación se realizó el estudio relacionado con la concentración de HCl necesaria para la elución. Para este experimento, el ácido clorhídrico empleado estaba diluido en una mezcla hidrometanólica (3:2, MetOH:H<sub>2</sub>O).

Con esta finalidad, se evaluaron ocho concentraciones de HCl (0; 0.00625; 0.125; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 M) para la elución con disoluciones metanólicas de LAS total de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En la **Tabla 4.5** se resumen los valores obtenidos.

**Tabla 4.5** - Influencia de la [HCl] en la elución de la SPE (SAX)

[HCl] (M)	LAS total (%)
0	1.6
0.0625	87.7
0.125	95.8
0.25	96.9
0.5	97.2
1.0	97.1
2.0	96.9
4.0	97.0

Mediante el análisis de datos provenientes de los resultados obtenidos, es notable que a partir de una concentración de 0.25 M de ácido clorhídrico, los resultados son muy similares. Entre tanto, para asegurar al máximo la capacidad de elución, se decidió optar por la máxima concentración estudiada. Esta opción fue tomada en vista de la posibilidad de encontrar muestras con un alto contenido de LAS donde la utilización de un ácido relativamente más diluido podría no asegurar una adecuada elución de los analitos, hecho que podría comprometer de la determinación del LAS en estas muestras.

De esta forma, para los siguientes experimentos a ser realizados, las condiciones seleccionadas para promover la correcta y adecuada etapa de Extracción en Fase Sólida utilizando cartuchos con SAX, se recogen la siguiente tabla.

**Tabla 4.6 - Condiciones de Extracción en Fase Sólida**

Condiciones de <i>SPE(SAX)</i>	
Flujo	2 -3 mL·min <sup>-1</sup>
Concentración de HCl	4.0 M

### 2.2.2.2 - Extracción en Fase Sólida con cartuchos C<sub>18</sub>

Con la finalidad de un mejor aprovechamiento de la versatilidad que puede proporcionar esta técnica, fue realizado un cambio en metodología descrita en el Capítulo anterior cuando se aplica a muestras sólidas (suelo agrícola). El cambio es que la carga procesada fue el volumen del extracto proveniente de la extracción asistida por el ultrasonido, superior al volumen empleado para muestras acuosas (~ 135 mL). De hecho, para este tipo de muestras, el cálculo del factor de concentración es distinto, ya que se debe llevar en consideración la masa de tierra empleada (5 gramos) y el volumen final del extracto obtenido. Por esta exigencia imperativa fue necesario una concentración, empleando el eluato del cartucho C<sub>18</sub> (3.0 mL), recogiéndolo en viales de 7.0 mL y llevado a sequedad mediante corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. A continuación, se reconstituye con 1.0 mL de una disolución hidrometanólica (3 MetOH: 2H<sub>2</sub>O) que contiene el patrón interno. Con este cambio, se logra una preconcentración del extracto de cinco veces, lo que evidentemente, contribuye a una disminución de los límites de cuantificación y detección del método.

### 2.2.2.3 - Extracción en Fase Sólida: Comparación de cartuchos

Fue realizado un estudio para evaluar la relación coste/eficiencia del proceso de *SPE* con el uso de cartuchos de marcas distintas pero con las mismas

fases estacionarias. Fue considerado como eficiencia el parámetro de recuperación del analito. Para esta finalidad, fueron evaluados cartuchos de *SAX* y  $C_{18}$  de dos marcas distintas:

**Tabla 4.7-** Cartuchos empleados

	Marca y precio (euros/50 unidades)	
$C_{18}$	<i>MERCK</i> = 171.72	<i>ISOLUTE</i> = 115.0
<i>SAX</i>	<i>J.T.BAKER</i> = 185.0	<i>ISOLUTE</i> = 170.0

#### A) Entre cartuchos $C_{18}$

Se realizó una comparación de las eficiencias obtenidas en el proceso de Extracción en Fase Sólida, empleando dos tipos de cartuchos  $C_{18}$  diferentes (*MERCK* e *ISOLUTE*). Este estudio se llevó a cabo pro duplicado a tres niveles de concentración de *LAS* total (0.2; 4.0; 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para cada uno de los cartuchos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 4.8 -** Desempeño de diferentes cartuchos  $C_{18}$

	Recuperación (% <i>LAS</i> total)	
	<i>MERCK</i>	<i>ISOLUTE</i>
0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	97.7	98.7
4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	97.9	98.4
10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	99.0	99.4

A los datos obtenidos, para cada concentración estudiada, se les aplicó el test de comparación de dos medias. Los valores de  $t_{calc}$  fueron todos inferiores al  $t_{tab}$ , por lo que se concluye por la hipótesis nula (no hay

diferencias significativas entre los dos valores obtenidos). De esta forma, los cartuchos seleccionados para los posteriores ensayos fueron de la marca *ISOLUTE*, debido a su menor coste.

### B) Entre cartuchos *SAX*

De igual forma a lo comentado en apartado anterior, se realizó una comparación de las eficiencias obtenidas con los dos tipos de cartuchos *SAX* diferentes (*J.T. BAKER* e *ISOLUTE*). En la **Tabla 4.9** se resumen los resultados obtenidos.

**Tabla 4.9** - Desempeño de diferentes cartuchos *SAX*

	Recuperación (% LAS total)	
	<i>J. T. BAKER</i>	<i>ISOLUTE</i>
<b>0.2 mg·L<sup>-1</sup></b>	98.0	98.3
<b>4.0 mg·L<sup>-1</sup></b>	97.1	97.9
<b>10.0 mg·L<sup>-1</sup></b>	96.6	97.1

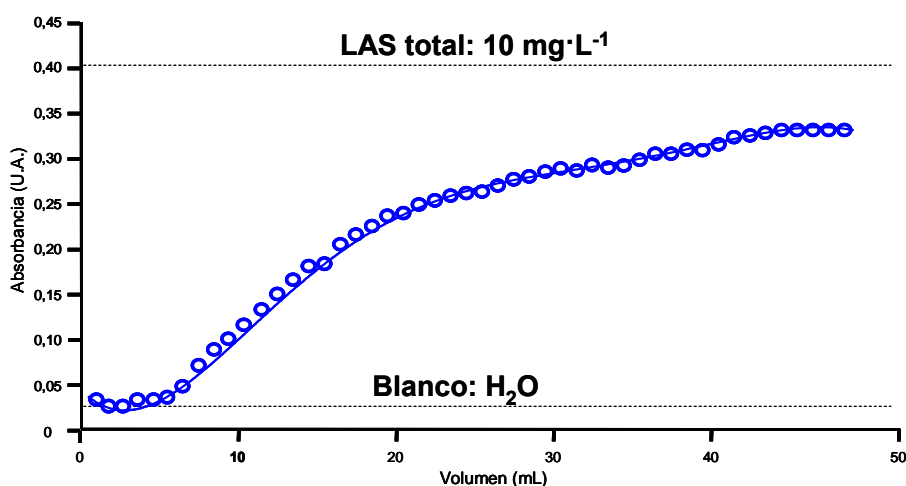
A los datos obtenidos, también se les aplicó el test de comparación dos medias. Los valores de  $t_{\text{calc}}$  fueron todos inferiores al  $t_{\text{tab}}$ , resultando la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre los dos valores obtenidos). De esta forma, los cartuchos seleccionados para los posteriores ensayos fueron de la marca *ISOLUTE*, debido a su menor coste.

#### 2.2.2.4 - Extracción en Fase sólida: Volumen de rotura

El volumen de rotura es el volumen al cual el cartucho empieza a saturarse ocurriendo, a partir de este volumen, pérdidas del analito. Esta característica está relacionada con la capacidad de retención de los sorbentes involucrados en el análisis.

Con esta finalidad fue realizada la verificación de este volumen tanto en los cartuchos *SAX* como  $C_{18}$ , separadamente. De esta forma, para cada cartucho, se preparó una disolución acuosa de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* total. El experimento fue realizado con un colector de fracciones y una bomba peristáltica a un flujo de  $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (flujo habitual de trabajo en *SPE*). Se hizo pasar una determinada cantidad de *LAS* en el cartucho hasta elucidar el volumen de rotura. Los cartuchos *SAX* y  $C_{18}$  habían sido previamente activados con 3.0 ml de n-Hexano y 5.0 mL de metanol, respectivamente y acondicionados con 5.0 mL de metanol y 5.0 mL de agua Milli-Q, respectivamente. Fueron colectados fracciones de 10 mL.

El análisis de las fracciones se llevó a cabo por la medida de la absorbancia UV/visible a una longitud de onda de 225 nm. En primer lugar se procedió el análisis de un blanco conteniendo solamente agua, para calibrar el aparato. Inmediatamente se evaluó la disolución de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* total para determinar la absorbancia máxima de referencia y a continuación, todas las muestras colectadas fueron analizadas. En la **Figura 4.2** se representa los resultados obtenidos para el cartucho de  $C_{18}$ .



**Figura 4.2** - Curva de volumen de rotura en los cartuchos  $C_{18}$

A través de los datos obtenidos, se puede concluir que los dos cartuchos presentan volúmenes de rotura muy diferentes, siendo de 76 mL para los cartuchos C<sub>18</sub> y mayores de 1 L para la SAX. Estas cantidades establecidas deberían ser consideradas limitantes y respetadas para los siguientes experimentos.

Basados en estos resultados, abajo se resume el proceso de Extracción en Fase Sólida necesario para determinar LAS en suelo:

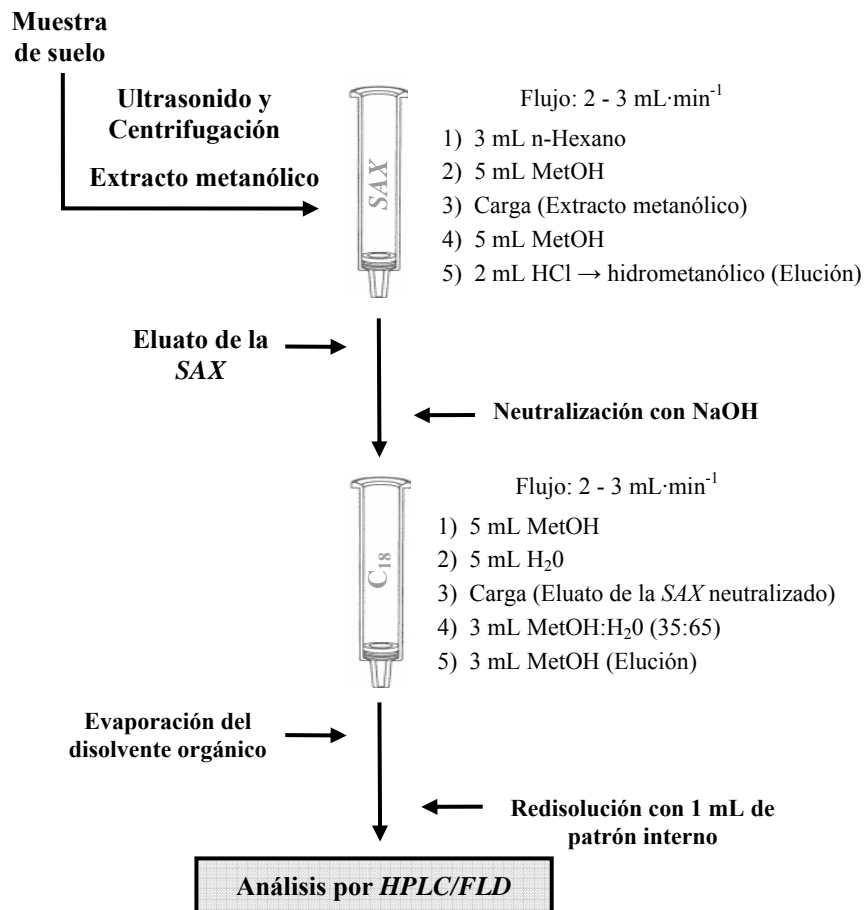


Figura 4.3 - Esquema de la metodología analítica para análisis de LAS en suelos, con énfasis en la Extracción en Fase Sólida



## 2.2 - Aspectos relacionados con la Extracción Asistida por Ultrasonido

Antes de la etapa de extracción asistida por ultrasonido fue necesario llevar a cabo una etapa previa.

### 2.3.1 - Etapa previa a la extracción

Para que los datos relacionados con la extracción asistida por ultrasonido fuesen coherentes y representativos es necesario que las muestras de suelo presentasen las mismas características (químicas, sobre todo relacionado con su composición; y físicas, relacionadas con su granulometría). Además, es necesario para este estudio, que las muestras de suelo estén exentas de LAS. Se establecieron algunos procedimientos en esta etapa previa para cumplir con estas premisas. Esta etapa se dividió en tres fases:

- *Colecta*: En esta fase, se colectaron muestras de suelo de una parcela agrícola de la Vega de Granada. Estas fueron colectadas de la superficie y posteriormente, se añadió una cantidad de formaldehído, aproximadamente 1% (m/v), con el objetivo de evitar la acción microbiológica y su consecuente alteración de la muestra.

- *Uniformización*: Las diferentes muestras de suelo se mezclaron para obtener una muestra representativa en una superficie de papel de aluminio, dejando secar a temperatura ambiente (25 °C) durante un período de 48 horas, aproximadamente. A continuación, se dividió en varias partes, se mezclaron, se trituraron en un mortero y, posteriormente, se tamizaron. Para esto se emplearon tres tamices (tamices nº 5, nº 14 y nº 30) que se colocaron en serie, obteniéndose al final muestras de un tamaño de partícula nunca superior a 0.597 mm de

diámetro. Las muestras fueron almacenadas en un refrigerador a una temperatura en torno a 4 °C en frascos ámbar.

- *Fortificación*: Para proceder a los estudios de la capacidad de extracción por del ultrasonido, las muestras de suelo se fortificaron con una cantidad conocida de LAS. Esta etapa se llevó a cabo de forma individual, es decir, que a cada una de las muestras pesadas se les añadía una determinada cantidad de disolución metanólica de LAS, y se mezclaba durante 1 minuto con el objetivo de homogeneizar la muestra. Posteriormente, se dejaban las muestras durante un tiempo aproximado de 17 horas, para que interaccionase el LAS con el suelo, previo a la extracción.

### 2.3.2 - Etapa de extracción

Cuando se trabaja con sonda de ultrasonido se tiene dos modos de operar: a) la sonda se introduce directamente en la muestra; y b) la sonda se introduce en un baño con líquido en el cual se encuentra cápsulas que contienen a la muestra. Está documentado que cuando se utiliza el ultrasonido<sup>1</sup> de forma directa, esto favorece el proceso de cavitación, contribuyendo a una mejor acción extractora, sin embargo, de esta forma el riesgo de daño de la punta de la sonda es mayor. Por lo que se eligió la modalidad de baño. Este modo operatorio presenta ventajas respecto al baño de ultrasonido convencional, como son la uniformidad en la dispensación de las ondas y mayor potencia. Esto contribuye a obtener unos mejores resultados y más reproducibles. Son numerosas las

---

<sup>1</sup> Luque-García J.L., Luque de Castro M.D., *Ultrasound: a powerful tool for leaching*. Trends Anal. Chem. 22; 41-47, 2003

variables inherentes a esta modalidad que afectan al proceso<sup>2</sup>, por lo que es fundamental y necesario el estudio de las mismas a fin de conocer las que más interfieren y así poder lograr una extracción más reproducible. Las condiciones más significativas fueron:

- 1) Líquido utilizado para la propagación de la onda de ultrasonido;
- 2) La cantidad del líquido empleado en el baño;
- 3) Viscosidad del líquido;
- 4) Temperatura del líquido;
- 5) Forma geométrica del baño;
- 6) Forma geométrica de la cápsula de extracción;
- 7) Composición material de la cápsula;
- 8) Distancia entre la sonda y la cápsula de extracción.

Teniendo en cuenta la bibliografía relacionada con el tema, se seleccionaron las siguientes condiciones.

- Se utilizó agua Milli-Q como líquido de propagación de la radiación ultrasónica. Para mantener constante la temperatura del agua se utilizó un criostato que controlaba la temperatura de todo el proceso de extracción, a través de la recirculación del agua a una temperatura de 25 °C. La cantidad de agua utilizada en el baño fue de 1500 mL.

- El recipiente donde se introduce la sonda fue un cilindro metálico que presentaba una altura de 13.5 cm, una base de 12.0 cm de diámetro y una pared de 0.2 cm de espesor, con capacidad volumétrica de 1750 mL y

---

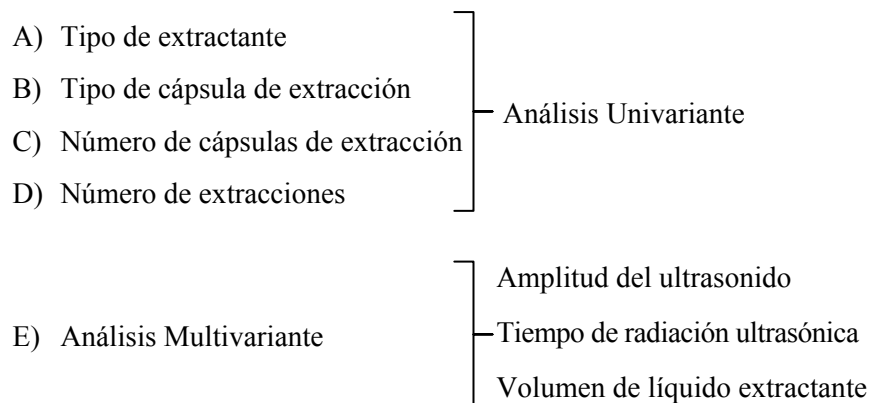
<sup>2</sup> Nascentes C.C., Mauro Korn M., Sousa C.S., Arruda M.A.Z., *Use of ultrasonic baths for analytical applications: A new approach for optimisation conditions*. J. Braz. Chem. Soc. 12; 57-63, 2001

cuyo material era de acero inoxidable.

- La distancia de las cápsulas de extracción con la sonda ultrasónica fue de 2.0 cm.

Con estas condiciones preestablecidas se procedió el estudio del proceso de extracción. En este estudio se buscó evaluar las variables que podrían influir significativamente en este proceso, seleccionando, los valores óptimos de las mismas para una mayor extracción, salvaguardando la integridad de la sonda.

Las variables evaluadas fueron las siguientes:



#### A) Tipo de extractante

Este ensayo pretendía encontrar el mejor disolvente para la extracción del LAS de las muestras de suelo. Con tal objetivo fueron testados tres disolventes (agua, metanol y etanol) y sus respectivas mezclas con proporciones 1:1.

Se prepararon 10 muestras de 5.0 gramos de suelo fortificadas con  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de LAS total en cápsulas de vidrio. La extracción se realizó por duplicado con una etapa de extracción empleando una potencia de 75% durante 20 minutos y usando una cápsula en cada extracción. El volumen de extractante fue de 100 mL. Después de la extracción, el extracto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, y el suelo sedimentado fue lavado con 30.0 mL del extractante correspondiente. Se modificó la etapa de acondicionamiento del primer cartucho (SAX) en la Extracción en Fase Sólida en función de la naturaleza del extractante. Se evaluó la recuperación de cada disolvente comparando los resultados obtenidos con una disolución patrón.

En la **Tabla 4.10** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.10 - Recuperación con diferentes disolventes empleados**

	C <sub>10</sub> (%)	C <sub>11</sub> (%)	C <sub>12</sub> (%)	C <sub>13</sub> (%)	Media (%)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	67.2	49.2	29.6	12.1	39.5
<b>MetOH: H<sub>2</sub>O (1:1)</b>	82.3	74.6	64.4	56.0	69.3
<b>MetOH</b>	80.4	79.3	77.1	69.3	76.5
<b>EtOH: H<sub>2</sub>O (1:1)</b>	81.2	70.9	60.4	52.9	66.4
<b>EtOH</b>	79.2	73.5	70.4	67.5	72.7

Se seleccionó el metanol como agente extractante para el resto de las experiencias.

### **B) Tipo de cápsula de extracción**

Con objeto de evaluar la influencia del material de la cápsula de

extracción, se emplearon dos tipos de cápsulas: una metálica (de acero inoxidable, con dimensiones de 10.1 x 4.0 cm D.I. y con 100 mL de capacidad volumétrica) y otra de vidrio (con 10.5 x 3.5 cm D.I. y con 100 mL de capacidad volumétrica). Se pesaron 5.0 gramos de suelo fortificado con  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de LAS total en cada cápsula. Se añade 100 mL de metanol y se introducen en el baño. Se emplearon dos cápsulas del mismo material en cada experimento situadas entre sí y respecto a la sonda a 2.0 cm de distancia, encontrándose en el centro del baño. El tiempo de radiación fue de 10 minutos con una amplitud de 75% y se realizó una única extracción. Después de la extracción, el extracto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, y el suelo sedimentado fue lavado con 30.0 mL de metanol y centrifugado nuevamente (este lavado se repitió para todos los ensayos posteriores). Finalmente, se aplicó el procedimiento de SPE, previamente a la separación cromatográfica de los homólogos del LAS. Este estudio fue realizado por duplicado para cada tipo de material de cápsula y los resultados de recuperación fueron posibles contrastando los resultados originarios de las muestras fortificadas con una disolución de referencia de LAS.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.11** - Recuperación de los homólogos del LAS en función del tipo de cápsulas

	C <sub>10</sub> (%)	C <sub>11</sub> (%)	C <sub>12</sub> (%)	C <sub>13</sub> (%)	Media (%)
<b>Metálica</b>	75.8	75.0	74.7	74.5	75.0
<b>Vidrio</b>	64.4	59.9	50.3	39.8	53.6

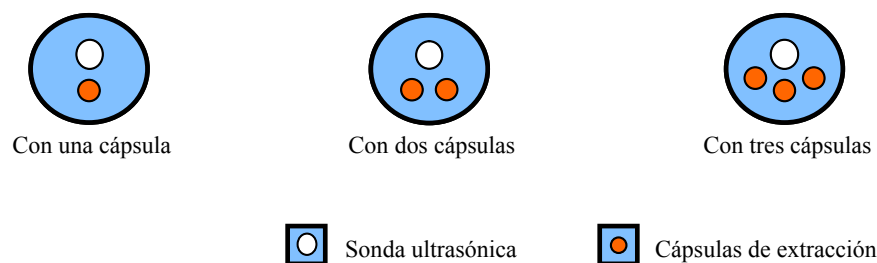
Como se observa en la tabla, los mejores resultados se obtienen cuando se emplean las cápsulas metálicas.

### C) Número de cápsulas de extracción

Con objeto de evaluar la influencia de la cantidad de cápsulas de extracción, se evaluaron los siguientes casos:

- 1 cápsula
- 2 cápsulas
- 3 cápsulas

Se prepararon las cápsulas metálicas pesando 5.0 gramos de suelo fortificado con  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de LAS total y 100 mL de metanol. El tiempo de radiación fue de 10 minutos con una amplitud de radiación de 75%, realizando una única extracción. La disposición de las cápsulas es la que se muestra en la **Figura 4.4**. La distancia entre las cápsulas y la sonda y entre sí fue de 2.0 cm. Para calcular la recuperación, se compararon las cantidades de LAS total provenientes de la extracción con la cantidad de LAS total de la disolución de referencia.



**Figura 4.4** - Estudio con las cápsulas de extracción

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 4.12** - Recuperación de LAS total en función de n° de cápsulas

	Recuperación (% LAS total)
1 cápsula	82.9
2 cápsulas	75.1
3 cápsulas	62.2

En base a estos resultados, se seleccionó para los siguientes experimentos la extracción con dos cápsulas. En este caso se estableció una solución de compromiso donde, sobre todo, prevalecieron los criterios de rapidez y protección del aparato frente a la recuperación.

#### **D) Número de extracciones**

Se evaluó la influencia del número de extracciones sobre la recuperación. Se llevaron a cabo una, dos y tres extracciones.

Para ello se pesó 5.0 gramos de suelo fortificado con  $4.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de LAS total en la cápsula metálica, por duplicado. Se añadieron 100 mL de metanol y se les aplicó la radiación ultrasónica con una potencia del 75% durante 10 minutos. En los casos de dos y tres extracciones, después de la aplicación de ultrasonido, de la centrifugación y del lavado, y se les volvió a añadir 100 mL de metanol al residuo sólido que se quedaba en la cápsula, aplicándole a éstos nuevamente el



ultrasonido. Los extractos metanólicos se juntaban. Los resultados de recuperación se calcularon contrastando los resultados obtenidos con los de la disolución de referencia.

Así, los resultados obtenidos fueron:

**Tabla 4.13** - Recuperación de LAS total en función del n° de extracciones

	Recuperación (% LAS total)
<b>1 extracción</b>	75.1
<b>2 extracciones</b>	81.9
<b>3 extracciones</b>	85.7

De este modo, se decidió elegir una extracción puesto que proporcionaba un buen resultado y no consumía tanto tiempo de análisis, con mayor coste (cantidad de disolvente) y mayor desgaste de la sonda. Así para cada extracción se emplearía 100.0 mL de líquido extractante, se centrifugaría, separando las fases, se echaría 30.0 mL de este líquido en el sedimento (para lavarlo), totalizando 130 mL, aproximadamente.

#### **E) Análisis multivariante**

Fue propuesto un diseño experimental para determinar de modo multivariante los valores de las tres variables que más pueden influir en el proceso de extracción y que están estrechamente relacionadas, como son: el volumen de extractante, amplitud (potencia) y tiempo de funcionamiento de la sonda. Por esta razón se llevó a cabo la optimización

simultánea de ellas mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta. Se aplicó para ello un diseño de tres factores central compuesto centrado en las caras. Con este tipo de diseño<sup>3</sup> se puede obtener información correlativa de estas variables simultáneamente, obteniendo datos que permiten evaluar y conocer las condiciones óptimas para este proceso.

El diseño se realizó en 3 bloques con un total de 17 puntos experimentales con 3 puntos centrales. El procedimiento operatorio seguido fue el que se describe a continuación: se prepararon una serie de cápsulas metálicas en las que se pesaron 5.0 gramos de suelo fortificado con 4.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total. En cada extracción se utilizaron dos cápsulas simultáneamente. Se llevó a cabo la extracción en conformidad con el modelo experimental establecido por el diseño. Los valores estudiados para cada una de las variables se muestran en la **Tabla 4.14**.

**Tabla 4.14** - Variables estudiadas en el diseño experimental

Variables	Valores
Volumen de MetOH (mL)	[20; 40; 60; 80; 100]
Tiempo de extracción (min.)	[2; 4; 7; 10; 12]
Amplitud de radiación (%)	[10; 25; 50; 75; 90]

La **Tabla 4.15** está compuesta de los resultados obtenidos para la

<sup>3</sup> Box G.W.P, Hunter W.G., Hunter J.S. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Ed. Wiley, New York, USA, 1978

relación de áreas entre el analito (LAS total) y el patrón interno para cada una de las condiciones experimentales ensayadas.

*Tabla 4.15 - Matriz del diseño experimental*

Volumen (mL)	Tiempo (min.)	Amplitud (%)	Área relativa
40	10	75	2.033
40	4	75	1.924
80	10	75	2.524
80	4	75	2.117
40	4	25	1.662
40	10	25	1.960
60	7	50	1.703
60	7	50	1.678
80	10	25	1.746
80	4	25	1.635
60	2	50	1.522
60	12	50	1.888
60	7	10	1.528
60	7	90	1.905
60	7	50	1.718
20	7	50	1.520
100	7	50	2.172

A nivel ilustrativo, en la *Figura 4.5*, se muestran la representación de las superficies de respuesta obtenidas.

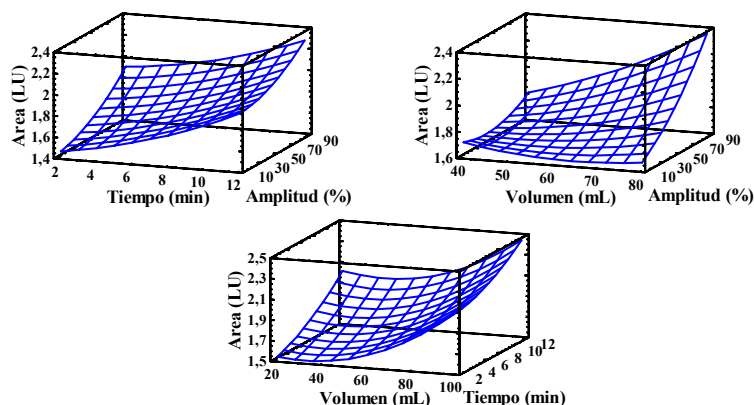


Figura 4.5 - Superficie de Respuesta entre la variables estudiadas

Evaluando los resultados, desde el punto de vista estadístico, se puede concluir que las tres variables estudiadas resultaron ser factores significantes, pudiendo influenciar en la extracción del LAS en el suelo y que, además, las variables que más pueden influir de forma simultánea en dicho proceso son el volumen de extractante y la amplitud de radiación (potencia).

Los valores óptimos según el diseño serían los extremos de los intervalos superiores. Sin embargo existe una mayor posibilidad de desgaste de la sonda tanto por el tiempo como por la potencia. Por esta razón, se seleccionaron valores representados en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.16 - Valores óptimos del diseño experimental

Valores seleccionados	
Volumen de MetOH (mL)	100
Tiempo de extracción (min.)	10
Amplitud de radiación (%)	75

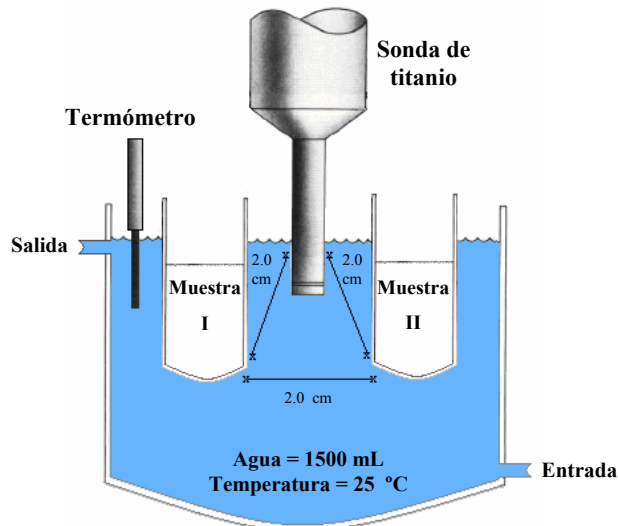
En la **Tabla 4.17** se muestran los valores seleccionados para todas las

variables estudiadas.

**Tabla 4.17 - Condiciones de extracción**

<b>Condiciones de Extracción por el Ultrasonido</b>	
Tipo de extractante	metanol
Tipo de cápsula	metálica
Número de cápsulas	2
Número de Extracciones	1
Volumen de metanol	100.0 mL
Tiempo	10.0 min
Amplitud	75%

En la siguiente figura se puede apreciar un esquema ilustrativo del proceso de extracción utilizando la sonda ultrasónica para la determinación del LAS en muestras de suelo.



**Figura 4.6 - Esquema sobre el proceso de extracción por ultrasonido**

### 2.3.3 - Reutilización de cartuchos

Con el proceso de extracción ya optimizado se realizó un estudio sobre la reutilización de los cartuchos utilizados en el tratamiento de muestra.

Con esta finalidad, fueron preparadas 24 muestras de suelo fortificadas a tres niveles de concentración: 0.2; 4.0; 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total (8 para cada concentración estudiada), pesando 5.0 gramos de muestra en las cápsulas metálicas. Para cada punto experimental (número de reutilización: 1; 2; 3; 4) se hizo una réplica. Se realizó la extracción con ultrasonido con las condiciones seleccionadas ya comentadas. Posteriormente se realizó la *SPE* con los cartuchos de *SAX* y *C<sub>18</sub> ISOLUTE* seguida de la evaporación total del metanol por corriente de nitrógeno y reconstitución con 1.0 mL de una disolución hidrometanólica de patrón interno. Al final se procedió el análisis de sus respectivas áreas comparadas con las áreas de tres muestras de suelo no fortificadas que fueron sometidas a todo el proceso (extracción, purificación, concentración) y que se les añadió LAS (la misma cantidad empleada para la fortificación de las muestras en tres niveles distintos) después de la elución del cartucho *C<sub>18</sub>* que, a su vez, también fue llevado a la sequedad y reconstituido con una disolución de patrón interno. Para este experimento se empleó un suelo exento de LAS.

A continuación se pueden observar los resultados obtenidos en la **Tabla 4.18**.

Tabla 4.18 - Reutilización de cartuchos

	Recuperación (% LAS total)			
	1 vez	2 veces	3 veces	4 veces
1.0 mg·kg <sup>-1</sup>	75.2	75.0	75.4	75.5
20.0 mg·kg <sup>-1</sup>	74.9	74.8	75.0	75.3
50.0 mg·kg <sup>-1</sup>	74.6	74.6	74.5	75.1

A los datos obtenidos, para cada concentración estudiada, se les aplicó el test de comparación de medias experimentales. Los valores de  $t_{\text{calc}}$  fueron todos inferiores al  $t_{\text{tab}}$ , resultando la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos). Mediante estos resultados obtenidos se optó por reutilizar los cartuchos de *SPE (SAX y C<sub>18</sub> - ISOLUTE)* hasta 4 veces seguidas.

### 3 - PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS EN SUELOS AGRÍCOLAS

#### 3.1 - Establecimiento y verificación del modelo

En primer lugar se comprobó la existencia o no de efecto matriz comparando los datos de un calibrado hecho con disoluciones patrones y uno con la matriz estudiada a través de un test estadístico (comparación de pendientes *b*).

Para establecer la curva de calibración de patrones, se prepararon una serie de matraces de 5.0 mL, en las que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución patrón de LAS. Seguidamente, se añadió el patrón

interno y se enrasó hasta la marca respetando la proporción hidrometanólica (3 MetOH:2 H<sub>2</sub>O), y se agitó para homogeneizar. Se prepararon 6 niveles de concentración de 0.5 a 50.0 mg·L<sup>-1</sup> de LAS total. De cada punto se realizaron dos réplicas experimentales.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente.

**Tabla 4.19 - Parámetros del calibrado realizado con patrón del LAS**

Homólogos	b (L·mg <sup>-1</sup> )	S <sub>b</sub>	a	S <sub>a</sub>	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>y/x</sub>	P <sub>lof</sub> (%)
C <sub>10</sub>	0.643	0.12·10 <sup>-3</sup>	-0.89·10 <sup>-2</sup>	4.79·10 <sup>-4</sup>	99.99	1.68·10 <sup>-3</sup>	31.0
C <sub>11</sub>	0.644	0.11·10 <sup>-3</sup>	-1.93·10 <sup>-2</sup>	5.31·10 <sup>-4</sup>	99.99	3.26·10 <sup>-3</sup>	26.2
C <sub>12</sub>	0.645	0.13·10 <sup>-3</sup>	-1.19·10 <sup>-2</sup>	4.32·10 <sup>-4</sup>	99.99	3.05·10 <sup>-3</sup>	23.9
C <sub>13</sub>	0.643	0.16·10 <sup>-3</sup>	-1.14·10 <sup>-3</sup>	6.20·10 <sup>-4</sup>	99.99	2.69·10 <sup>-3</sup>	31.3

Para las muestras de suelo, se estableció las funciones de calibración siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: se preparó una serie de cápsulas de extracción, pesando 5.0 gramos de suelo y fortificándolas el día anterior (aproximadamente 17 horas antes). Se preparó 8 niveles de concentración (0.2; 0.6; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 7.0; 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total). Cada una de las concentraciones fue preparada por triplicado y analizado cada punto por duplicado. Se siguieron los procedimientos de extracción por ultrasonido, Extracción en Fase Sólida y cromatográficos anteriormente descritos. La curva de calibración se construyó utilizando la relación de áreas analito/patrón interno *versus* concentración del analito.

Los parámetros estadísticos del modelo calculado para el método de



determinación de homólogos de LAS en suelos, son los que se describen en la **Tabla 4.20**.

**Tabla 4.20** - Parámetros estadísticos para la determinación de homólogos del LAS en suelos

Homólogos	b (kg·mg <sup>-1</sup> )	S <sub>b</sub>	a	S <sub>a</sub>	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>y/x</sub>	P <sub>lof</sub> (%)
C <sub>10</sub>	2.422	9.10·10 <sup>-4</sup>	2.74·10 <sup>-2</sup>	5.70·10 <sup>-4</sup>	99.96	3.46·10 <sup>-3</sup>	11.2
C <sub>11</sub>	2.421	1.01·10 <sup>-3</sup>	6.00·10 <sup>-2</sup>	1.57·10 <sup>-3</sup>	99.92	8.14·10 <sup>-3</sup>	28.11
C <sub>12</sub>	2.421	1.04·10 <sup>-3</sup>	6.31·10 <sup>-2</sup>	1.38·10 <sup>-3</sup>	99.90	7.16·10 <sup>-3</sup>	24.30
C <sub>13</sub>	2.422	9.39·10 <sup>-4</sup>	8.31·10 <sup>-2</sup>	9.81·10 <sup>-4</sup>	99.89	4.92·10 <sup>-3</sup>	31.82

Teniendo en cuenta que las muestras de suelos fueron concentradas 5 veces, las pendientes de las curvas de calibración referentes a los homólogos para el suelo resultaron ser de un 25%, aproximadamente más bajas que las correspondientes a las del calibrado con patrones. Se compararon estas pendientes, y, efectivamente había diferencia significativa para todos los componentes de la serie homóloga. También se constató que las ordenadas eran diferentes significativamente, con lo cual, para cada homólogo, había dos rectas de calibrado diferentes y no paralelas, es decir, que esta diferencia podía ser debido a la presencia de errores sistemáticos constantes y/o proporcionales ( $a$  y  $b \neq$ ). Por tanto, la cuantificación de LAS en suelo agrícola se llevó a cabo con muestras fortificadas.

### 3.2 - Eficiencia de recuperación

Se evaluó la eficiencia global de la metodología desarrollada en la

recuperación total (involucrando todas las etapas: extracción, purificación, concentración, separación y detección) de los analitos. Para esto, se llevó a cabo el estudio de recuperación de cantidades conocidas de LAS en las muestras de suelo. Estas muestras fueron fortificadas para que se obtuviera 4 niveles de concentración: 0.2; 1.0; 5.0 y 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total. La recuperación fue evaluada comparando las relaciones de áreas con muestras fortificadas con las relaciones de áreas proporcionadas por muestras de suelo no fortificadas que fueron sometidas a todo el proceso (extracción, purificación, concentración) y que se les añadió LAS (la misma cantidad empleada para la fortificación de las muestras a 4 niveles de concentraciones) después de la elución del cartucho C<sub>18</sub> que, a su vez, también fue llevado a sequedad y reconstituido con una disolución de patrón interno. Las muestras fortificadas fueron analizadas por triplicado. La media de recuperación de los homólogos de LAS están representadas en la siguiente tabla.

**Tabla 4.21** - Recuperación y desviación estándar ( $n = 3$ ) del método para la determinación de LAS en suelos

	Recuperación → R (%) ± desviación estándar			
	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	1.0 mg·kg <sup>-1</sup>	6.0 mg·kg <sup>-1</sup>	10.0 mg·kg <sup>-1</sup>
C <sub>10</sub>	74.8 ± 0.2	74.9 ± 0.2	75.2 ± 0.1	75.2 ± 0.1
C <sub>11</sub>	75.1 ± 0.4	75.0 ± 0.1	75.2 ± 0.4	75.1 ± 0.3
C <sub>12</sub>	75.2 ± 0.1	75.1 ± 0.1	75.1 ± 0.1	75.1 ± 0.2
C <sub>13</sub>	75.3 ± 0.3	75.1 ± 0.1	75.3 ± 0.1	75.0 ± 0.3
<b>LAS total</b>	75.1 ± 0.3	75.0 ± 0.1	75.2 ± 0.2	75.1 ± 0.3

### 3.3 - Verificación del modelo

Para la verificación del modelo, se tuvieron en cuenta dos parámetros:

1) Evaluación del fallo de ajuste ( $P_{Loj}$ ): para determinar la tendencia lineal de los datos:

Se observa en la **Tabla 4.20** que en todos los casos el valor  $P$  obtenido fue mayor del 5%, por tanto se concluye por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

2) Evaluación de la condición de homocedasticidad, es decir, homogeneidad de varianzas:

Para esta finalidad se empleó el análisis gráfico de los residuos.

En todos los casos se puede afirmar que se cumplen las premisas fijadas para el cumplimiento de la condición de homocedasticidad, según el criterio adoptado.

### 3.4 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de este parámetro de calidad, se tuvo en cuenta la desviación estándar de la regresión  $S_{y/x}$ , la pendiente  $b$ , y fue estimado por extrapolación la desviación estándar del blanco tal como se describe en el **Capítulo 2**.

Los resultados obtenidos son los mostrados en la **Tabla 4.22**.

**Tabla 4.22** - Límites de detección y cuantificación para la determinación de homólogos del LAS en suelo

Homólogos	$S_0^*$	b (kg·mg <sup>-1</sup> )	LD (μg·kg <sup>-1</sup> )	LQ (μg·kg <sup>-1</sup> )
C <sub>10</sub>	3.39·10 <sup>-3</sup>	2.422	4.2	14.0
C <sub>11</sub>	7.99·10 <sup>-3</sup>	2.421	9.9	33.0
C <sub>12</sub>	7.02·10 <sup>-3</sup>	2.421	8.7	29.1
C <sub>13</sub>	4.83·10 <sup>-3</sup>	2.422	7.2	24.1

\*  $S_0$ : desviación estándar del blanco estimada a partir de la  $S_{y/x}$

### 3.5 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 4.23** se muestra los valores obtenidos para cada uno de los homólogos del LAS. En estas tablas se presentan el Rango Dinámico Lineal (*RDL*), la linealidad (*LIN*) y la sensibilidad analítica ( $S_{analítica}$ ).

**Tabla 4.23** - Parámetros representados para cada uno de los homólogos de LAS

Homólogos de LAS	Rango Lineal (mg·kg <sup>-1</sup> )	LIN (%)	$S_{analítica}$ (μg·kg <sup>-1</sup> )
C <sub>10</sub>	13.7 - 1.414	99.965	1.4
C <sub>11</sub>	33.0 - 3.272	99.957	3.4
C <sub>12</sub>	27.3 - 2.974	99.957	3.0
C <sub>13</sub>	19.7 - 2.340	99.961	2.0

En cuanto a la linealidad, calculada como linealidad “*on-line*”, según los datos obtenidos para cada uno de los componentes homólogos del LAS, los valores encontrados fueron los que se representan en la **Tabla 4.24**.

En todos los casos la linealidad es superior al 99%. Se puede, por tanto, afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

### 3.6 - Exactitud: Precisión y Veracidad

La exactitud del método fue valorada en función de dos parámetros: la precisión y la exactitud.

Con la finalidad de evaluar la precisión del método, la reproducibilidad y la repetibilidad fueron estimadas a 4 niveles de concentraciones (0.2; 1.0; 6.0; 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total). Las muestras de suelo fortificados fueron sometidas a extracción/purificación/concentración y analizadas por triplicado. El procedimiento fue repetido por tres veces en el mismo día para evaluar la variabilidad intra-día y también fue repetido durante tres días consecutivos para determinar la variabilidad inter-día. La repetibilidad y la reproducibilidad fueron expresadas como desviación estándar relativa (*DER*) de las concentraciones estudiadas.

Los resultados se muestran en la **Tabla 4.24**.

**Tabla 4.24** - Precisión del método para la determinación de LAS en suelos

	DER (%)	
	Intra-día (n=12)	Inter-día (n=36)
C <sub>10</sub>	0.9 - 1.0	1.6
C <sub>11</sub>	1.3 - 1.6	1.8
C <sub>12</sub>	1.3 - 2.1	1.8
C <sub>13</sub>	2.1 - 2.2	2.4
<b>LAS total</b>	1.1 - 1.6	1.5

Con la finalidad de evaluar la veracidad del método, se prepararon muestras fortificadas a 4 niveles de concentraciones (0.2; 1.0; 6.0; 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total). El suelo, una vez fortificado, fue sometido a extracción/purificación/concentración y analizado por triplicado. El procedimiento fue repetido tres veces en el mismo día y también repetido por tres días consecutivos. La exactitud fue expresada en valores absolutos con los cuales se pueden comparar con los valores de referencia de concentración de analito añadido (estipulado por el valor de concentración dado por el calibrado con muestras fortificadas).

Los resultados están expuestos en la **Tabla 4.25**.

**Tabla 4.25** - Veracidad del método para la determinación de LAS en suelos obtenidos por el valor medio de los resultados de 3 determinaciones a 0.2; 1.0; 6.0; 10.0 mg·kg<sup>-1</sup> de LAS total; medidas en 3 días (n = 12 para cada día)

	Veracidad			
	Conc. añadida (mg·kg <sup>-1</sup> )	Conc. encontrada (mg·kg <sup>-1</sup> )	t <sub>calc.</sub>	P (%)
C <sub>10</sub>	0.0283	0.0282 ± 0.0007	0.51	62.86
	0.1414	0.1408 ± 0.0037	0.45	67.03
	0.8484	0.8517 ± 0.0141	0.71	50.98
	1.4140	1.4065 ± 0.0161	1.39	22.31
C <sub>11</sub>	0.0654	0.0653 ± 0.0014	0.31	77.17
	0.3272	0.3276 ± 0.0065	0.11	91.56
	1.9644	1.9522 ± 0.0258	1.42	21.50
	3.2740	3.2561 ± 0.0633	0.85	43.55

Tabla 4.25 - Continuación

	Veracidad			
	Conc. añadida (mg·kg <sup>-1</sup> )	Conc. encontrada (mg·kg <sup>-1</sup> )	t <sub>calc.</sub>	P (%)
C <sub>12</sub>	0.0595	0.0593 ± 0.0007	1.00	36.20
	0.2974	0.3001 ± 0.0073	1.09	32.54
	1.7844	1.7824 ± 0.0417	0.14	89.05
	2.9740	2.9601 ± 0.0365	1.14	30.54
C <sub>13</sub>	0.0468	0.0470 ± 0.0013	0.40	70.82
	0.2340	0.2322 ± 0.0052	1.04	34.69
	1.4040	1.4008 ± 0.0302	0.32	75.99
	2.3400	2.3261 ± 0.0321	1.30	25.13
LAS total	0.2000	0.1997 ± 0.0015	0.64	54.92
	1.0000	1.0007 ± 0.0148	0.15	88.89
	6.0000	5.9871 ± 0.0507	0.68	52.66
	10.0000	9.9393 ± 0.1066	1.71	14.82

A los datos obtenidos se les aplicó el test de comparación de una media experimental con un valor conocido. Los valores de  $t_{\text{calc}}$  fueron todos inferiores al  $t_{\text{tab}}$ , resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre la concentración encontrada y la añadida), demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

### 3.7 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se muestran en la **Tabla 4.23**.

### 3.8 - Aplicación del método

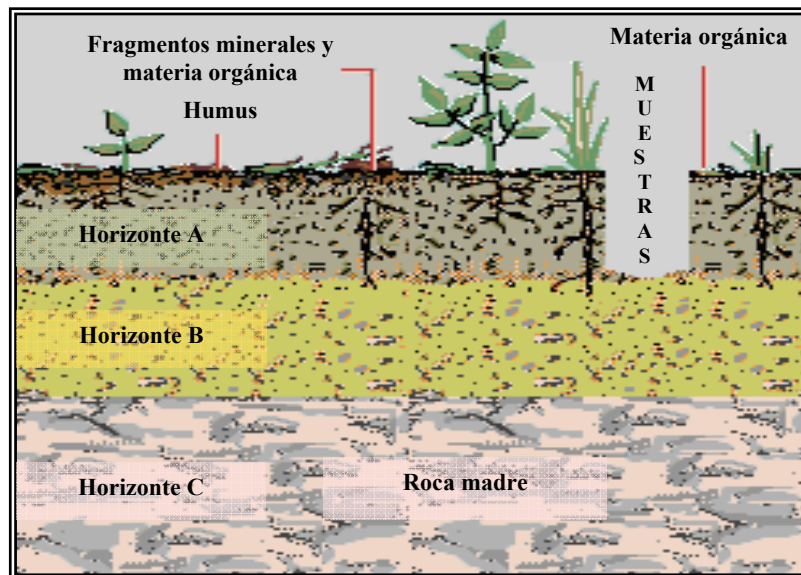
Con la obtención de los parámetros analíticos necesarios, fue evaluada la aplicación del método para el análisis del contenido del analito en la matriz seleccionada. Se hizo una valoración de la cantidad de los homólogos e isómeros del LAS presentes en distintos suelos agrícolas que fueron colectados de 12 diferentes puntos de la zona de la Vega de Granada. Esta es una región fértil destinada a la agricultura que está situada a 5 km de la ciudad de Granada y constituye uno de los más importantes acuíferos de Andalucía. En esta zona, las muestras fueron colectadas en distintas localidades: en Belicena (4 puntos); en Churriana de la Vega (2 puntos); en Granada (1 punto); Las Gabias (5 puntos). Una de las muestras procedentes de Belicena era de la Finca Santa María (FSM). Esta finca presenta una zona experimental que está dividida en diez parcelas de 36 m<sup>2</sup> cada una de ellas. En una de las parcelas se tomaron muestras de suelo a diferentes profundidades (2; 10; 20; 30; 40; 50; 60 cm). Esta parcela correspondía a una zona sin cultivo identificada como **muestra 1**. También fueron colectadas otras muestras en esta parcela, siendo **muestra 2**: sin cultivo; **muestra 3**: con cultivo, pero solamente realizando la colecta en la capa superficial.

En las demás zonas analizadas, las muestras fueron colectadas de la capa superficial (aproximadamente 0 - 10cm) y en todas ellas no había ningún cultivo en el momento de la colecta. Para la determinación del LAS en estos suelos, las muestras fueron procesadas por triplicado y cada punto experimental analizado por duplicado, totalizando seis puntos por muestra. En este estudio se determinó no sólo el LAS total y sus homólogos, representado en la tabla como cantidad de LAS total (a través de la suma de los valores respectivos de los referidos homólogos)



sino también, se evaluó la proporción de cada isómero en la composición centesimal de los suelos analizados. En la **Figura 4.7** se muestra una representación de la toma de muestra realizada.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.26**.



**Horizonte A:** Rico en materia orgánica, humus y donde sostiene la mayoría de la raíces de las plantas.

**Horizonte B:** Rico en minerales lixiviados y con menos humus que la capa superior.

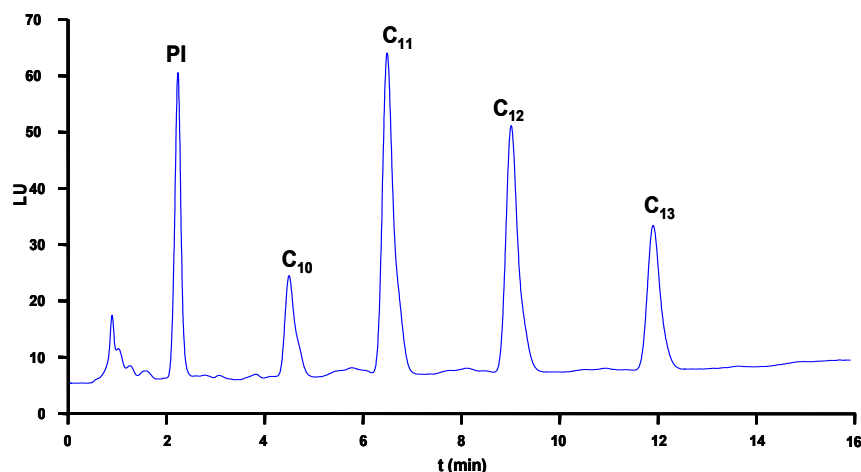
**Horizonte C:** Rico en minerales y muy parecido a la roca madre.

**Figura 4.7** - Esquema de toma de muestra en el campo (muestra 1 de la FSM)

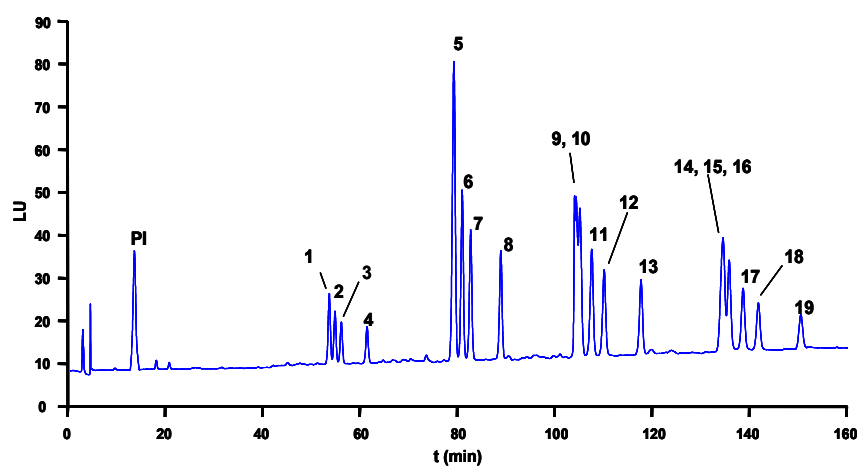
Tabla 4.26 - Concentración y composición de LAS total encontrada en los suelos analizados

Muestras de suelos Agrícolas	LAS total (mg kg <sup>-1</sup> )	Distribución de la cadena alquímica (%)															
		C <sub>10</sub>			C <sub>11</sub>			C <sub>12</sub>			C <sub>13</sub>						
		2Ø	3Ø	4Ø	5Ø	2Ø	3Ø	4Ø	5+6Ø	2Ø	3Ø	4Ø	5+6Ø	2Ø	3Ø	4Ø	5+6+7Ø
1 - 2 cm - Belicena (FSM)	0.477	1.57	1.79	2.03	2.35	3.08	4.20	8.30	11.69	3.66	4.72	5.79	13.75	4.15	4.89	6.86	21.18
1 - 10 cm - Belicena (FSM)	0.463	1.67	1.75	2.08	2.21	3.07	4.12	8.53	12.04	3.57	4.62	6.02	13.88	3.85	4.87	6.82	20.89
1 - 20 cm - Belicena (FSM)	0.455	1.61	1.70	2.12	2.22	2.78	3.88	8.56	11.87	3.46	4.49	6.22	14.16	3.89	4.95	6.88	21.22
1 - 30 cm - Belicena (FSM)	0.437	1.57	1.83	2.25	2.31	2.71	3.53	9.39	10.92	3.21	4.45	6.61	14.51	3.62	5.24	6.82	21.06
1 - 40 cm - Belicena (FSM)	0.411	1.64	1.65	2.12	2.35	3.41	3.93	9.95	11.99	2.71	4.90	7.09	15.14	3.03	4.57	6.57	18.94
1 - 50 cm - Belicena (FSM)	0.403	1.66	1.56	2.17	2.44	3.34	3.79	9.24	11.49	2.63	4.91	8.07	14.98	3.25	4.38	6.99	19.10
1 - 60 cm - Belicena (FSM)	0.395	1.68	1.51	2.17	2.45	3.38	4.08	9.42	12.00	2.28	4.88	8.57	13.68	3.80	4.39	7.06	18.70
2 - Belicena (FSM)	0.602	0.77	1.03	1.10	1.42	3.11	4.79	8.25	12.78	3.00	5.48	9.45	15.78	2.91	5.30	5.92	18.91
3 - Belicena (FSM)	0.405	1.87	2.29	2.46	3.00	3.08	5.27	7.81	15.29	3.86	5.51	6.51	16.49	2.94	4.34	7.77	11.56
4 - Belicena	0.302	1.49	1.58	1.97	2.28	3.21	4.90	7.25	12.65	3.65	4.59	8.94	16.77	3.51	4.86	7.47	14.87
5 - Granada	0.599	2.18	2.37	2.50	2.63	4.84	5.98	7.30	10.74	2.62	5.22	7.66	15.43	3.37	5.17	6.89	15.10
6 - Churriana de la Vega	0.297	2.29	2.46	2.84	3.11	3.12	5.07	7.56	14.65	3.88	4.72	9.39	14.80	3.27	5.15	8.55	9.16
7 - Churriana de la Vega	0.326	1.48	1.59	1.71	2.17	2.91	4.38	5.48	15.09	2.27	6.86	11.52	14.57	4.86	5.87	7.77	11.46
8 - Las Gabias	0.266	2.02	2.19	2.51	2.87	4.99	6.81	8.26	9.20	5.51	7.68	9.21	11.68	4.08	5.01	7.15	10.86
9 - Las Gabias	0.325	1.97	2.68	2.64	2.77	3.04	4.77	9.76	14.73	3.26	7.01	10.29	13.47	3.21	4.27	5.81	10.33
10 - Las Gabias	0.356	1.90	2.24	2.49	2.58	3.47	6.53	8.51	11.26	3.08	6.94	10.37	14.02	4.12	5.02	6.61	10.86
11 - Las Gabias	0.331	1.82	2.13	2.26	2.50	4.53	5.50	7.83	9.57	4.30	6.41	8.12	11.46	4.60	6.15	10.23	12.61
12 - Las Gabias	0.351	1.73	1.92	2.12	2.59	3.67	5.01	8.25	11.18	1.99	5.58	9.22	15.85	4.35	5.82	8.83	11.89
LAS comercial		2.66	2.94	3.63	4.91	5.04	5.67	7.23	14.78	3.92	4.65	5.79	15.38	2.77	3.19	4.06	13.38

En las **Figuras 4.8** y **4.9**, se puede apreciar los cromatogramas típicos obtenidos tras la separación cromatográfica de los homólogos e isómeros de LAS, utilizando una muestra de suelo fortificado.



**Figura 4.8** - Cromatograma correspondiente a la determinación de homólogos de LAS ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) junto con el patrón interno (PI) de muestras de suelo agrícola



**Figura 4.9** - Cromatograma correspondiente a la determinación de isómeros de LAS ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) junto con el patrón interno (PI) en muestras de suelo agrícola. Los picos se identifican como: (1)  $5\text{OC}_{10}$ ; (2)  $4\text{OC}_{10}$ ; (3)  $3\text{OC}_{10}$ ; (4)  $2\text{OC}_{10}$ ; (5) 5 y  $6\text{OC}_{11}$ ; (6)  $4\text{OC}_{11}$ ; (7)  $3\text{OC}_{11}$ ; (8)  $2\text{OC}_{11}$ ; (9)  $6\text{OC}_{12}$ ; (10)  $5\text{OC}_{12}$ ; (11)  $4\text{OC}_{12}$ ; (12)  $3\text{OC}_{12}$ ; (13)  $2\text{OC}_{12}$ ; (14)  $7\text{OC}_{13}$ ; (15)  $6\text{OC}_{13}$ ; (16)  $5\text{OC}_{13}$ ; (17)  $4\text{OC}_{13}$ ; (18)  $3\text{OC}_{13}$ ; (19)  $2\text{OC}_{13}$

Analizando los resultados provenientes de la aplicación de la metodología, desde el punto de vista cualitativo, la principal importancia está en la comprobación de la presencia de este analito en los suelos estudiados. Desde el punto de vista cuantitativo, los datos adquiridos son escasos y circunstanciales pero proporcionan una información útil con respecto a la calidad de suelo basado en el nivel de concentración de LAS encontrado.

Para analizar el comportamiento del LAS en suelos agrícolas, el estudio debería ser más detallado (por ejemplo: que todas las muestras fuesen tomadas a varias profundidades y/o con una mayor frecuencia de colecta y/o en función de las estaciones del año), con la finalidad de caracterizar este compartimiento cuidadosamente y, de esta forma, originar resultados más concluyentes y representativos sobre el suelo analizado.

Con relación a la información útil de esta evaluación, basados en los datos de todos los suelos analizados, el LAS está presente en pequeñas cantidades (inferior a  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), de forma que el valor encontrado está por debajo del límite establecido como criterio para evaluar la calidad del suelo de acuerdo con la guía técnica<sup>4</sup> redactada por la Comisión Europea (1996), por lo que estas cantidades de LAS no constituyen ningún problema o amenaza ecotoxicológica.

Esta cantidad encontrada en los suelos puede ser debido a diversas condiciones o factores, siendo las fuentes de exposición más comunes y empleadas, las siguientes:

---

<sup>4</sup> European Commission, Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/CEE on risk assessment for new substances and Commission Regulation (EC) N° 1488/94 on risk assessment for existing substances, Part II: Environmental risk assessment, 1996

- La utilización de lodos para enmendar suelos agrícolas. Esto ya es una práctica frecuente en la mayoría de los países europeos para aumentar la fertilidad del suelo, de hecho, algunos autores consideran esta fuente, la principal vía de contaminación<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup> terrestre para el LAS.

- El empleo, para irrigación, de aguas residuales sin estar depuradas o procedentes de zonas donde el tratamiento de estas aguas es deficiente, presentando cantidad consideradas de LAS en su contenido. Esta vía puede ser considerada como una fuente significativa de contaminación ambiental<sup>10</sup>.

- Uso de pesticidas o herbicidas que contengan LAS en sus formulaciones. Esta causa puede aportar LAS al ambiente y simultáneamente puede contribuir a que, si el aporte es proveniente de esta fuente, ralentizar el proceso de biodegradación de esta sustancia ya que la microbiota del suelo, se ve afectada.

- Uso de fertilizantes artificiales y/o de estiércol de vaca que contengan LAS<sup>7</sup>.

---

<sup>5</sup> Holt M.S., Matthijs E., Waters J., *The concentrations and fate of LAS in sludge amended soils*. Water Res. 23; 749-759, 1989

<sup>6</sup> Jensen J., *Fate and effects of LAS in the terrestrial environment*. Sci. Tot. Environ. 226; 93-111, 1999

<sup>7</sup> Carlsen L., Metzon M.-B., Kjelsmark J., *LAS in the terrestrial environment*. Sci, Tot. Environ. 290; 225-230, 2002

<sup>8</sup> Waters J., Holt M.S., Matthijs E., *Fate of LAS in sludge amended soils*. Tenside Surf. Det. 26; 129-135, 1989

<sup>9</sup> Andreu V., Picó Y. (2004). *Determination of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation products in soils by liquid chromatography-electrospray-ion trap multiple stage mass spectrometry*. Anal. Chem. 76; 2878-2885, 2004

<sup>10</sup> Ding W.-H., Farm J.C.H., *Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sediments using pressurized liquid extraction and ion-pair derivatization gas chromatography-mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta 408; 291-297, 2000

También se observa un cambio en la distribución de los componentes del LAS que, de acuerdo con algunos trabajos previos, como Mortensen<sup>11</sup> *et al.*, (2001) y KÜchler & Kujawa<sup>12</sup> (1998), este cambio puede ser explicado por una diferencia del fenómeno de adsorción de los distintos componentes del LAS, donde aquéllos que presentan una mayor longitud de la cadena alquílica son más fuertemente adsorbidos en la fracción orgánica del suelo (Westall<sup>13</sup> *et al.*, 1999). Otro fenómeno que puede contribuir para una alteración de la distribución de los componentes del LAS es la biodegradación, donde según algunas referencias bibliográficas como Setzkorn<sup>14</sup> *et al.* (1964) y Swisher<sup>15</sup> (1963), postulan dos situaciones que podrían modificar esta distribución estando relacionadas con: longitud de la cadena alquílica (cuanto mayor la cadena, mayor su tasa de biodegradación) y, la localización del grupo fenilo (cuanto más extremo se encuentre, mayor su biodegradabilidad).

Finalmente, se puede concluir que el LAS está aparentemente presente en todos los suelos analizados. Su presencia puede ser debido a que estos suelos agrícolas, en algún momento, entraron en contacto con esta sustancia por alguna de las posibles fuentes ya citadas y posiblemente se quedó una pequeña cantidad remanente de LAS por precipitación bajo la forma de sal cálcica o magnésica ya que la ocurrencia de estas sales en el medioambiente puede ocasionar la precipitación del LAS, hecho que contribuiría para

---

<sup>11</sup> Mortensen G.K., Egsgaard H., Ambus P., Jensen E.S., Grøn, C. *Influence of plant growth on degradation of LAS in sludge-amended soil*. J. Environ. Qual. 30; 1266-1270, 2001

<sup>12</sup> KÜchler T., Kujawa M., *Verhalten von LAS während der passage durch kurze laborlysimeters* (en alemán). Tens. Surf. Det. 35; 476-479, 1998

<sup>13</sup> Westall J.C., Chen H., Zhang W., Brownawell B.J., *Sorption of linear alkylbenzene sulfonates on sediment materials*. Environ. Sci. Technol. 33; 3110-3118, 1999

<sup>14</sup> Setzkorn E.A., Huddleston R.L., Allred R.C., *An evaluation of the river die-away technique for studying detergent biodegradation*. J. Am. Oil. Chem Soc. 41; 826-830, 1964

<sup>15</sup> Swisher R.D., *Biodegradation of ABS in relation to chemical structure*. J. Water Poll. Control Fed. 35; 877-892, 1963

reducir su biodisponibilidad y, por tanto, influenciar en su toxicidad y biodegradación (Berna<sup>16</sup> *et al.*, 1989; de Wolf & Feijtel<sup>17</sup>, 1998).

---

<sup>16</sup> Berna J.L., Ferrer A., Moreno A., Prats D., Bevia F.R., *The fate of LAS in the environment*. Tenside Surf. Det. 26; 101-107, 1989

<sup>17</sup> de Wolf W., Feijtel T., *Terrestrial risk assesment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils*. Chemosphere 36; 1319-1343, 1998





---

---

**CAPÍTULO 5**  
**ESTUDIO DE CAMPO**

---

---



## 1 - INTRODUCCIÓN

En el presente Capítulo se aborda el estudio del *LAS* en un determinado ambiente natural con objeto de proponer modelos capaces de predecir su comportamiento en dicho medio.

Con esta finalidad se llevaron a cabo experimentos preliminares que permitieron caracterizar química y físicamente las matrices involucradas (suelo agrícola y agua de pozo). Posteriormente se realizaron ensayos en el laboratorio a fin de dilucidar los fenómenos de adsorción y desorción del *LAS* en suelo, estudiando su comportamiento tanto en forma discontinua (en tanque - *batch*) como en flujo continuo, utilizando para ello columnas rellenas de suelo. A continuación, se llevó a cabo el estudio de lixiviación y de biodegradación estacional en campo, para ello se puso a punto la metodología adecuada para realizar la captación de los analitos en los lixiviados y en el suelo. Finalmente se discuten los modelos obtenidos en los estudios de laboratorio y se obtienen las conclusiones oportunas. El trabajo planteado responde al siguiente esquema:

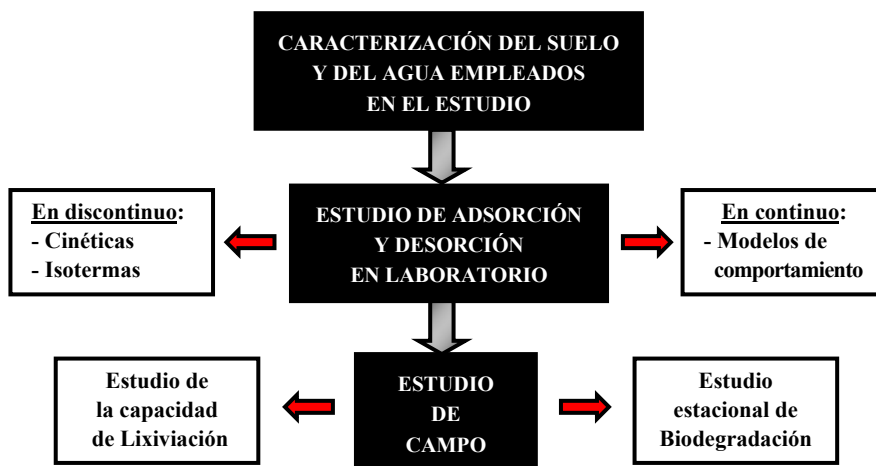


Figura 5.1 - Esquema del estudio realizado

## 2 - CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y DEL AGUA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

Como parte del estudio del comportamiento del LAS en suelo de la Vega de Granada, en primer lugar se realizó la caracterización tanto del suelo como del agua (de pozo) utilizados.

### 2.1 - Estudio del suelo empleado

El estudio de caracterización se ha llevado a cabo en un suelo de la Huerta Santa María perteneciente a la Vega de Granada, situada en el municipio de Belicena a 5 Km de la capital y de coordenadas  $37^{\circ} 11'09,50''$  N;  $3^{\circ} 41'39,85''$  O (Figura 5.2). La muestra de suelo se tomó en el horizonte correspondiente a los primeros 25 cm de profundidad.

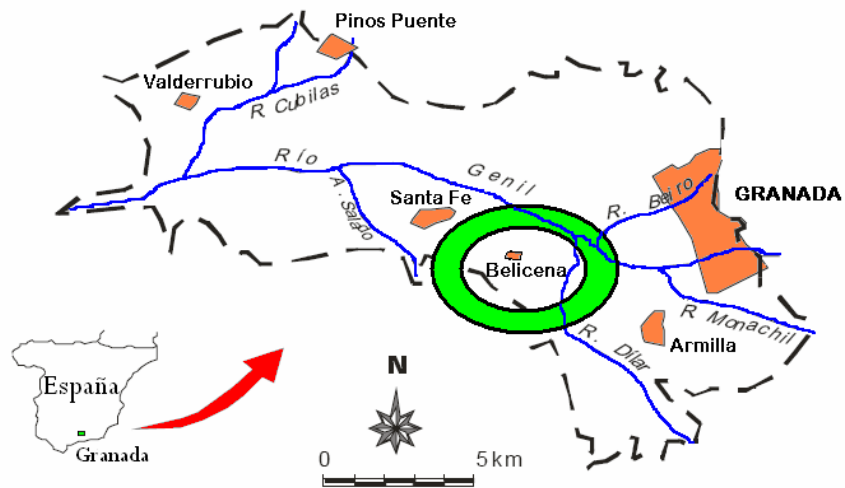


Figura 5.2 - Zona de la Vega de Granada

Una vez en el laboratorio, el suelo se secó al aire, posteriormente fue triturado y pasado por un tamiz de 2 mm de malla. Los elementos gruesos

superiores a este tamaño (grava) se lavaron con agua, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente fueron pesados. Todas las pruebas que se indican a continuación se realizaron en el Instituto del Agua de la Universidad de Granada.

### 2.1.1 - Propiedades físicas del suelo

#### A) Textura

El análisis granulométrico, de acuerdo con el método de Robinson<sup>1</sup> (1922), requiere, como paso previo, lograr la individualidad de las partículas elementales. Para conseguirlo, es necesario llevar a cabo las siguientes tareas:

⇒ Destrucción de agentes cementantes: Dado que la materia orgánica es el principal agente cementante, es necesaria su destrucción para individualizar las partículas minerales, lo que se consigue mediante su oxidación con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Se pesan 20 g de muestra, previamente tamizada a 2mm y secada al aire, y se introducen en un vaso de 100 mL.
- Se añaden 200 mL de agua y 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% (p/v); se agita la mezcla y se deja reaccionar durante 8 horas.
- Trascorridas 8 horas, la mezcla se calienta a 80° C en placa calefactora,

---

<sup>1</sup> Robinson G.W., *A new method for mechanical analysis of soil and other dispersion*. J. Agr. Ac. 12; 306-321, 1922

hasta evaporar el líquido por desecación.

⇒ Dispersión de la muestra: La dispersión de la muestra se lleva a cabo combinando métodos mecánicos (agitación) y métodos químicos, para lo que se utiliza como dispersante hexametáfosfato sódico ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> al 10%. Se efectúan las siguientes operaciones:

- Se trata con agua el residuo seco resultante de la etapa anterior, lavando repetidamente las paredes del vaso de precipitado, con objeto de recuperar todas las partículas adheridas al mismo.
- Se trasvasa todo el contenido del vaso a un frasco de 1000 mL, con la ayuda de un embudo, y se le añaden 25 mL de ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub>.
- Se agita mecánicamente durante 8 horas.

⇒ Clasificación de fracciones: Una vez dispersas las partículas, se procede a su separación en función del tamaño. Para ello se ha usado un método que se basa en la velocidad de sedimentación. De acuerdo con la ley de Stokes (régimen laminar), la velocidad estacionaria de caída de un sólido esférico en el seno de un fluido depende de su tamaño, según la expresión:

$$V_{\infty} = g (\rho_p - \rho_f) D_p^2 / 18\mu \quad (5.1)$$

donde  $V_{\infty}$  es la velocidad estacionaria de caída ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $g$  es la aceleración de la gravedad ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$ ),  $\rho_p$  es la densidad de la partícula ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $\rho_f$  es la densidad del fluido ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $D_p$  es el diámetro de la partícula (cm) y  $\mu$  es la viscosidad dinámica del fluido (poises).

La técnica se basa en tomar alícuotas de la suspensión a diferentes tiempos y profundidades, permitiendo la recogida de todas las fracciones: las arcillas y los limos, que se determinan por pesada de dos alícuotas, y las arenas por tamizado posterior.

El procedimiento consiste, una vez dispersa la muestra, en trasvasar todo el contenido del frasco a probetas con tapón, enrasar a 1000 mL y dejar que se establezca la temperatura durante una hora.

Se mide la temperatura de la suspensión y, de acuerdo con ella y según la tabla de Stokes, se determina el tiempo adecuado de sedimentación para realizar las extracciones con la pipeta de Robinson (20 mL en cada una), a una profundidad constante, marcada en la pipeta (10 cm). Así, en primer lugar, se extraen limos finos + limos gruesos + arcillas ( $< 50 \mu\text{m}$ ), en segundo lugar, limos finos + arcillas ( $< 20 \mu\text{m}$ ), y por último, arcillas ( $< 2 \mu\text{m}$ ). Las alícuotas de la suspensión se recogen en una serie de crisoles tarados. Se secan los crisoles en estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 24 horas, y después se pesan en una balanza de precisión.

Por otra parte, se vierte todo el contenido de las probetas en un tamiz, cuya luz de malla corresponda con el límite inferior de tamaño de las arenas ( $50 \mu\text{m}$ ), lavado perfectamente de tal manera que en el tamiz sólo quede arena. Se pasan las arenas a una cápsula grande, previamente tarada, y se secan en la estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez secas las arenas, se tamizan mecánicamente a través de una columna de tamices, con objeto de separar las arenas según las diferentes fracciones. Las arenas retenidas en cada uno de los tamices se recogen en crisoles previamente tarados y se pesan.

\* Cuantificación de las distintas fracciones:

- Porcentaje de los limos gruesos ( $LG$ ) en el peso total de muestra (20 - 50  $\mu\text{m}$ ):

$$LG = \{[(F_1 - Ph) \cdot 50] / m\} - \{[(F_2 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (5.2)$$

- Porcentaje de los limos finos ( $LF$ ) en el peso total de muestra (2 - 20  $\mu\text{m}$ ):

$$LF = \{[(F_2 - Ph) \cdot 50] / m\} - \{[(F_3 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (5.3)$$

- Porcentaje de las arcillas ( $AR$ ) en el peso total de la muestra (< 2  $\mu\text{m}$ ):

$$AR = \{[(F_3 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (5.4)$$

- Porcentaje de las arenas totales ( $A$ ) en el peso total de la muestra (> 50  $\mu\text{m}$ ):

$$A = (F_4 / m) \cdot 100 \quad (5.5)$$

donde  $m$  es la masa de suelo secado al aire, exento de materia orgánica (g),  $Ph$  es el peso de hexametáfosfato en alícuota (g),  $F_1 = LG + LF + AR$ ;  $F_2 = LF + AR$ ;  $F_3$  es la fracción de las arcillas (g) y  $F_4$  es la fracción de las arenas (g).

**B) Densidad aparente**

Se define como la razón de la masa de suelo seco respecto al volumen del mismo en su estado natural, es decir, considerando tanto el volumen que ocupan las partículas sólidas como el que ocupan los poros.



El procedimiento (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986) consiste en recoger una muestra inalterada con un cilindro indeformable dos o tres días después de una precipitación o riego intenso. Una vez en el laboratorio, se seca en estufa a 105 °C hasta peso constante ( $m$ ) y se deja enfriar en desecador para su posterior pesada.

La densidad aparente se calcula según la expresión:

$$\rho = m / V \quad (5.6)$$

donde  $m$  es la masa de suelo seco (g) y  $V$  es el volumen de la muestra que ocupa el cilindro (cm<sup>3</sup>), es decir,  $V = 3.1416 (d/2)^2 \times h$ , ( $d$  es el diámetro del cilindro en cm y  $h$  es la altura del cilindro en cm).

### C) Densidad real

Corresponde a la densidad de las partículas sólidas del suelo, es decir, a la masa del suelo dividida por el volumen que ocupan sus partículas. Para su determinación (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986) se introducen en un picnómetro 50 g de suelo y se pesa todo el conjunto ( $P_1$ ). A continuación se añade tolueno, aproximadamente hasta la mitad de su volumen, se introduce el picnómetro en un desecador a vacío y se aplica una presión aproximadamente 100 mm Hg inferior a la atmosférica, para facilitar la eliminación del aire que queda entre las partículas.

Seguidamente, se llena el matraz con tolueno, por exceso, y se mantiene en

---

<sup>2</sup> Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas*. Ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, España, p.182, 1986

un baño dotado de termostato a una temperatura constante de 20° C, durante una media hora. Transcurrido este tiempo, se enrasa y se pesa ( $P_3$ ). Previamente se habrá determinado el peso del picnómetro vacío ( $P$ ) y el peso del picnómetro aforado enrasado con tolueno ( $P_2$ ).

La densidad real se calcula a partir de la expresión:

$$\rho_r = (P_1 - P) \cdot \rho_t / [(P_1 - P) - (P_3 - P_2)] \quad (5.7)$$

donde  $\rho_t$  es la densidad del tolueno ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ),  $P$  es la tara del picnómetro (g),  $P_1$  es el peso del picnómetro más suelo (g),  $P_2$  es el peso del picnómetro lleno de tolueno (g), y  $P_3$  es el peso del picnómetro más tolueno más suelo (g).

#### D) Porosidad

Es la relación entre el volumen de poros y el volumen total de la muestra de suelo. Se puede calcular indirectamente, a partir de los valores de la densidad aparente y de la densidad real, mediante la expresión (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986):

$$\theta = [(\rho_r - \rho) / \rho_r] \cdot 100 \quad (5.8)$$

donde  $\theta$  es la porosidad (%),  $\rho_r$  es la densidad real ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) y  $\rho$  es la densidad aparente ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ).

#### E) Humedad

El contenido en humedad del suelo en las condiciones del laboratorio se

determina por diferencia de pesada entre una muestra de suelo antes y después de ser sometida a desecación a 105° C hasta peso constante (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986). El porcentaje en peso de agua contenida en cien gramos de suelo seco, se halla mediante la expresión:

$$H = [(P_H - P_S) / P_S] \cdot 100 \quad (5.9)$$

donde  $H$  es la humedad del suelo (%),  $P_H$  es el peso del suelo húmedo (g) y  $P_S$  es el peso del suelo seco (g).

#### F) Ensayo de permeabilidad

La determinación de la permeabilidad se ha llevado a cabo utilizando un permeámetro de carga variable. Se coloca la muestra en un recipiente cilíndrico y se compacta hasta tratar de reproducir la porosidad inicial. A la parte inferior de este recipiente se conecta un tubo manométrico de vidrio, de pequeño diámetro, lleno de agua hasta un nivel inicial ( $h_0$ ), que debe estar por encima del desagüe del recipiente que contiene la muestra, de modo que, iniciando el ensayo, el agua aportada por el tubo manométrico fluye a través de la muestra ensayada. Entonces se mide el descenso del nivel de agua observado en el tubo en un tiempo determinado  $t$ . La permeabilidad se calcula mediante la expresión:

$$K = 2,3 \cdot [(a \cdot l) / (A \cdot t)] \cdot \log (h_0/h) \quad (5.10)$$

donde  $K$  es la permeabilidad ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $a$  es la sección del tubo manométrico de vidrio ( $\text{cm}^2$ ),  $l$  es la altura del molde (cm),  $A$  es la sección del molde ( $\text{cm}^2$ ),  $t$  es el tiempo (s),  $h_0$  es el nivel inicial del agua en el tubo

manométrico y  $h$  es el nivel del agua en el tubo manométrico en el tiempo  $t$ .

### 2.1.1.1 - Resultados

Las características físicas y mineralógicas resumidas en la **Tabla 5.1** muestran que el suelo estudiado es de textura fina, con predominio de limos finos y en menor proporción de limos gruesos y arcillas, estipulando que se trata de un suelo de tipo fluvisol calcáreo. Entre las arcillas predomina la illita, a la que le sigue en abundancia la esmectita. Las arcillas menos abundantes son las del grupo de la caolinita. Debido a que el suelo estudiado presente una textura fina, un valor de la porosidad del 42.18% y un valor relativamente bajo de la permeabilidad ( $4.42 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ), hacen con que éste posea características que condicionan una baja capacidad de infiltración.

A continuación, se recogen los resultados obtenidos.

**Tabla 5.1 - Propiedades físicas del suelo estudiado**

Propiedades físicas			
Propiedades generales		Textura	
Densidad aparente ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )	1.39	Arenas totales (%)	20.00
Densidad real ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )	2.75	Limos gruesos (%)	24.50
Porosidad (%)	42.18	Limos finos (%)	33.55
Permeabilidad ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$4.42 \cdot 10^{-5}$	Arcillas (%)	21.95
Composición mineralógica			
Illita (%)	39.72	Caolinita (%)	10.25
Calcita (%)	23.71	Feldespatos (%)	8.34
Esmectita (%)	13.33	Cuarzo (%)	4.65

### 2.1.2 - Propiedades químicas del suelo

A continuación se comenta las características químicas estudiadas.

#### A) pH

La determinación del pH (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986) se ha efectuado sobre cuatro suspensiones, dos de ellas de suelo en agua y otras dos de suelo en disolución de KCl 0.1 N (la determinación de pH en KCl 0.1 N se realiza para estudiar la capacidad de intercambio iónico del suelo en estudio).

Para preparar las suspensiones se pesan 10 g de suelo, a los que se añade el volumen correspondiente de agua o de disolución de KCl 0.1 N (25 mL). Transcurrida una hora, se efectúa la medida del pH mediante un pH-metro convencional, que ha sido calibrado empleando al menos dos disoluciones reguladoras de pH (7.02 y 4.00).

#### B) Materia orgánica

Se ha utilizado el método de Tyurin<sup>3</sup> (1951), que es un método volumétrico de oxido-reducción por retroceso, en el que se oxida la materia orgánica del suelo, con un oxidante en exceso ( $K_2Cr_2O_7$ , dicromato potásico), y posteriormente se valora la cantidad de dicromato reducido mediante sal de Mohr ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ ). El procedimiento, establecido en el método citado, consiste en pesar 0.2 g de suelo finamente molido en un mortero de ágata, que se introducen en un

---

<sup>3</sup> Tyurin I.V., *Analytical procedure for a comparative study of soil humus*. Trudy Pochr. Inst. Dokuchaeva 33: 5-21, 1951

matraz erlenmeyer de 100 mL. En este matraz, se añade sulfato de plata (catalizador), arena de mar (para homogeneizar la ebullición) y 10 mL de dicromato potásico 0.4 N. Se introduce el conjunto en un baño de arena. Se lleva a ebullición y se mantiene durante 5 minutos más. Con el mismo procedimiento se hace una prueba en blanco. Por último se valora el dicromato potásico en exceso, usando como indicador ácido fenilantranílico y como valorante Sal de Mohr. El viraje se produce de violeta-azulado a verde. El contenido en materia orgánica (% en peso) se calcula mediante la expresión:

$$\text{M.O. (\%)} = \{[(V_b - V) \cdot F \cdot 0,3] / m\} \cdot F_1 \cdot F_2 \quad (5.11)$$

donde  $V_b$  es el volumen de Sal de Mohr gastado en valorar el blanco (mL),  $V$  es el volumen de sal de Mohr gastado en valorar la muestra (mL),  $F$  es el factor de sal de Mohr,  $F_1$  es el factor de corrección para calcular la cantidad de carbono orgánico, que se obtendría mediante el método de combustión seca, teniendo en cuenta la cantidad de carbono inorgánico y orgánico ( $F_1 = 1.17$ ),  $F_2$  es el factor de Van Bemmelen ( $F_2 = 1.724$ ) y  $m$  es la masa de la muestra de suelo utilizada (g).

### C) Aniones y cationes solubles del suelo

Los iones solubles del suelo son aquellos que se disuelven al incorporar agua al suelo seco; se miden en el extracto recogido de la pasta de saturación que se prepara añadiendo agua lentamente a la muestra de suelo, hasta que todos los poros estén llenos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986). Para conseguirlo, se toman 200 o 300 g de muestra de suelo y se colocan en un recipiente. Se añade lentamente agua destilada, al mismo tiempo que se agita con una espátula. Cuando toda la

muestra ha sido humedecida, se continúa añadiendo agua destilada, pero en fracciones cada vez más pequeñas. Una vez conseguido el estado de saturación de la muestra del suelo, el recipiente debe ser tapado y se deja reposar durante un tiempo mínimo de 10 horas.

Para la obtención del extracto de saturación se conecta un kitasato a una bomba de vacío; sobre el kitasato se sitúa un embudo büchner (al que se le habrá colocado previamente un papel de filtro), se aplica vacío después de rellenar el embudo con una cantidad suficiente de la pasta saturada y se mantiene esta situación hasta haber obtenido suficiente volumen de extracto de saturación.

Una vez obtenido el extracto, se determinan mediante Cromatografía Iónica los aniones (cloruros, nitratos, nitritos, fosfatos y sulfatos) y los cationes (sodio, calcio, magnesio, potasio y amonio). Los resultados obtenidos se expresan en miligramos del ion por kilogramo de suelo, teniendo en cuenta la humedad de la pasta saturada preparada, que se determina mediante el método descrito para determinar la humedad.

#### **D) Nitrógeno total**

El procedimiento (Bouat & Crouzet<sup>4</sup>, 1965) para determinar el nitrógeno total se divide en dos etapas:

⇒ La primera consiste en la destrucción de la materia orgánica y la transformación del nitrógeno en sales amónicas. En esta fase la materia orgánica se oxida a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por ebullición con ácido sulfúrico

---

<sup>4</sup> Bouat A., Crouzet C., *Notes techniques sur un appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils)*. Annals of Agriculture 16; 107-118, 1965

concentrado, al tiempo que los citados compuestos nitrogenados se transforman en  $\text{NH}_4^+$ , al formarse  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Para acelerar esta reacción, se emplean catalizadores ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Se}^{+2}$ ) y además se añaden sales que eleven el punto de ebullición del ácido, para evitar su evaporación.

⇒ La segunda etapa se subdivide a su vez en dos fases: la primera consiste en hacer reaccionar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  producido en la digestión con  $\text{NaOH}$ , para formar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_3$  gaseoso; este último es separado por arrastre con aire y condensación. En la segunda fase se valora el  $\text{NH}_3$  con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido, en presencia de un indicador adecuado.

De acuerdo con el método descrito, se colocan 2 g de suelo tamizado a un tamaño de 2 mm en un tubo de digestión, se les añade 1g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de solución sulfúrica de selenio, se calienta durante 1 hora a 100 °C y durante otra hora y media a 350 °C. Finalizado el calentamiento, se retira el tubo del digestor. Una vez enfriado, al tubo de digestión se le añade agua, hasta un volumen total de 25 mL, y unas gotas de fenolftaleína. A continuación, el tubo de digestión se acopla en el soporte de un destilador automático, donde se adiciona  $\text{NaOH}$  hasta el viraje del indicador a rojo y se comienza la destilación. Finalmente, en un matraz erlenmeyer de 250 mL, al cual se añaden 25 mL de ácido bórico al 4%, se recoge el destilado, que posteriormente se valora con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0.005 N.

El porcentaje de nitrógeno en la muestra de suelo se calcula según la expresión:

$$N_T = (V \cdot N \cdot F \cdot 14) / (10 \cdot m) \quad (5.12)$$



donde  $N_T$  es el contenido en nitrógeno (%),  $V$  es el volumen de ácido gastado en la valoración (mL),  $N$  es la normalidad del ácido sulfúrico usado para la valoración,  $F$  es el factor de corrección del ácido sulfúrico usado para la valoración y  $m$  es la masa de la muestra (g).

### **E) Determinación analítica de la capacidad de cambio**

La determinación de la capacidad de cambio catiónico (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación<sup>2</sup>, 1986) consta de los siguientes pasos:

- Reemplazamiento completo de los cationes de cambio existentes en el suelo por otro catión.
- Eliminación del exceso por lavado.
- Desplazamiento del catión adsorbido y determinación cuantitativa del mismo.

Procedimiento: el primer paso consiste en colocar 5 g de suelo tamizado y secado al aire con una columna de intercambio iónico; se añade entonces acetato amónico 1N hasta un volumen equivalente a 4/5 de la capacidad de la columna y se deja en reposo un mínimo de 8 horas para que se produzca el intercambio. Transcurrido este tiempo, se procede a abrir el embudo y a recoger el lixiviado, que se enrasa a un matraz aforado de 100 mL. En este lixiviado se miden las bases de cambio:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ .

A continuación, se rellena la columna con acetato sódico 1.0 N y se deja en contacto 8 horas para que se produzca el intercambio. Pasado este

tiempo, se abre la columna para recoger el lixiviado, que es desechado. Para eliminar el exceso de  $\text{Na}^+$ , se lava varias veces con alcohol el conjunto suelo-columna.

Se añade de nuevo acetato amónico 1.0 N y se mantiene en contacto otras 8 horas. Transcurrido este tiempo, se recoge el lixiviado, se enrasa en un matraz aforado de 100 mL; en este lixiviado se mide el  $\text{Na}^+$ , de modo que el resultado corresponde a la capacidad de intercambio catiónico total.

La capacidad total de cambio catiónico representa la capacidad máxima de cationes que pueden ser adsorbidos por el complejo de cambio, expresado en meq de  $\text{Na}^+$  adsorbido por 100 g de suelo.

## **F) Carbonatos**

Un peso determinado de muestra seca se introduce en crisol y horno de mufla, se eleva gradualmente la temperatura hasta 560 °C (a esta temperatura los carbonatos no se ven alterados) y se mantiene durante 3 h, se deja enfriar y se pesa (de la diferencia de pesos obtienes el contenido en materia orgánica). Se vuelve a introducir el crisol en la estufa y se calienta gradualmente hasta 950 °C, se deja 2 h. Enfriar y pesar. De esta forma descontada la materia orgánica se puede conocer el contenido en carbonatos.

### **2.1.2.1 - Resultados**

Cuanto a las características químicas, éstas pueden ser apreciadas en la **Tabla 5.2**, donde se nota que este suelo presenta un valor de pH

ligeramente básico (7.9). La presencia de KCl en el medio provoca una disminución de aproximadamente una unidad en el valor del pH, pasando a ser más neutro, lo que indica que el suelo actúa como cambiador iónico, con gran capacidad para la fijación de hidrogenoiones.

La materia orgánica presentó un porcentaje de 1.81%, y los óxidos de  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$  que fueron determinados por fluorescencia de Rayos-X, representan el 4.97 y 12.76% de la totalidad de los minerales detectados por la misma metodología. Además, las superficies de los óxidos pueden adquirir cargas eléctricas y así interactuar con especies cargadas, por medio de interacciones electrostáticas; la adquisición de cargas ocurre por ionización de los grupos  $\text{OH}^-$  superficiales; las cargas negativas las adquieren cuando el pH del medio es alto, por disociaciones de los grupos hidroxilo, mientras que las cargas positivas las adquieren por protonación. En general, se observa que con los valores del pH del suelo estudiado (7.9), dichos óxidos e hidróxidos presentan una carga positiva, que, junto a la calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) y al óxido de magnesio ( $\text{MgO}$ ), confieren al suelo una sensible capacidad de intercambio de aniones.

Otra de las propiedades importantes relacionada con la capacidad de adsorción del suelo es la capacidad de cambio catiónico, que corresponde al total de las cargas negativas disponibles para fijar cationes en disolución. Esto puede ser debido a hecho de que la illita y la esmectita presentan cargas permanentes negativas, mientras que la carga de la caolinita depende del pH, sin embargo, dado que el pH del suelo estudiado tiene, un valor muy cercano a 7, la caolinita también presenta carga negativa junto con el feldespato, el cuarzo, el óxido de manganeso, la materia orgánica y el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), lo que le confiere al suelo una importante capacidad de interactuar con los cationes del líquido

intersticial que ocupa los poros. El suelo de la Vega posee una elevada capacidad de cambio de 22.12 meq de sodio/100 g de suelo.

También se observa que en el suelo se encuentra una elevada concentración de sulfatos y cloruros solubles, lo que está relacionado con la composición de la roca madre de la zona.

En la siguiente tabla, se representa los resultados obtenidos tras los análisis realizados.

**Tabla 5.2 - Propiedades químicas suelo estudiado**

<b>Propiedades químicas</b>			
pH (KCl)	7.40	<b>Cationes solubles del suelo (mg·Kg<sup>-1</sup> de suelo)</b>	
pH (agua)	7.90	Ca <sup>+2</sup>	44.50
Materia orgánica (%)	1.81	Mg <sup>+2</sup>	37.00
Carbono orgánico (%)	1.05	Na <sup>+</sup>	42.50
Carbonatos (% CO <sub>2</sub> )	15.4	<b>Minerales</b>	
Nitrógeno total (%)	0.07	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	12.76
Capacidad de cambio (meq Na <sup>+</sup> /100g suelo)	22.12	SiO <sub>2</sub> (%)	46.35
<b>Bases de cambio (meq / 100 g de suelo)</b>		Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	4.97
Ca <sup>+2</sup>	29.78	MnO (%)	0.08
Mg <sup>+2</sup>	2.56	MgO (%)	4.01
Na <sup>+</sup>	0.34	Na <sub>2</sub> O (%)	1.76
K <sup>+</sup>	0.49	K <sub>2</sub> O (%)	2.15
<b>Aniones solubles del suelo (mg·Kg<sup>-1</sup> de suelo)</b>		TiO <sub>2</sub> (%)	0.61
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	241.00	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	0.24
Cl <sup>-</sup>	91.50	CaO (%)	10.52

En resumen, las propiedades físico-químicas del suelo estudiado revelan, en primer lugar, que los compuestos del mismo, al tener carácter coloidal y poseer cargas eléctricas, pueden contribuir de forma relevante a la interacción sólido-fluido y a su capacidad de cambio. Ello pone de manifiesto la capacidad de este suelo para retener los solutos presentes en el agua intersticial proveniente del agua de riego. En segundo lugar, es evidente que las propiedades físicas del suelo que dependen de su textura y estructura, influyen de manera significativa y decisiva en el comportamiento del mismo frente al movimiento vertical del agua.

## 2.2 - Estudio del agua de pozo empleado

Se ha realizado la determinación de los siguientes iones (**aniones:** cloruros, sulfatos, fosfatos, nitratos y nitritos; **cationes:** sodio, calcio, magnesio, potasio, hierro, aluminio) mediante cromatografía iónica, empleando para ello un cromatógrafo marca *DIONEX*, modelo DX300.

Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio con  $0.22\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro, utilizando una jeringa de 10 mL de capacidad, equipada con un cono (luer), antes de ser separadas por cromatografía.

Con la finalidad de separar los aniones de la muestra, ésta fue inyectada en una corriente de eluyente ( $3.5\ \text{mM Na}_2\text{CO}_3/1.0\ \text{mM NaHCO}_3$ ), con un caudal de  $1.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , y la separación de los aniones se realizó a través de una columna separadora de iones Ionpac AS 14 (4x250 mm), compuesta por una resina pelicular intercambiadora de aniones con base de divinilbenceno. El equipo está provisto adicionalmente de precolumnas Ionpac AS (4x5 mm) para proteger la columna analítica. Los aniones

separados en las columnas pasaron a través de una supresora de membrana (*AMM-II*), a través de la cual pasaba continuamente una solución regeneradora ácida de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 N. En la membrana supresora, los aniones separados se transformaban en su forma ácida de alta conductividad y el disolvente se convierte en ácido carbónico de baja conductividad. Los aniones separados se detectaron con un detector de conductividad y compensación de temperatura de 1.3 a 2% por grado centígrado. Dichos aniones se identificaron a partir del tiempo de retención comparado con el de los patrones adecuados y la determinación cuantitativa se realizó integrando el área del pico mediante un integrador (*DIONEX 4400*), que recibía la señal del cromatógrafo, evaluando las áreas correspondientes y trazando los cromatogramas.

Fue realizado una calibración con los patrones de los aniones estudiados, comprobando previamente la linealidad de la respuesta relacionada con el intervalo de concentraciones elegido de todos los compuestos. Las concentraciones fueron:

**Tabla 5.3 - Calibrado con los aniones**

Concentraciones ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
Cl <sup>-</sup>	[3.0; 20.0]
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	[1.0; 5.0]
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[1.0; 10.0]
PO <sub>3</sub> <sup>-4</sup>	[1.0; 5.0]
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	[3.0; 20.0]

Para la separación de los cationes, el fundamento fue el mismo sólo que

en este caso se utilizó una columna de separación de cationes Ionpac CS 12A (4x250 mm), con una fase estacionaria de grupo divinilbenceno y un grupo funcional de carboxilato. El eluyente fue una solución  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N y la supresión, a diferencia del caso de los aniones, no fue química sino eléctrica, de modo que se utilizó una supresora de membrana CSRS - ultra - 4 mm. Para la detección, igual que en el caso anterior, se utilizó una célula de conductividad. El caudal para el eluyente de cationes se fijó en  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y el detector se ajustó a  $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La fuente de alimentación de la supresora se mantuvo a una corriente de 100 mA. Como en el caso de los aniones, después de estabilizar el sistema, se inyectó un patrón, en este caso de cationes, para su comprobación.

Fue realizado una calibración con los patrones de los cationes estudiados, comprobando previamente la linealidad de la respuesta relacionada con el intervalo de concentraciones elegido de todos los compuestos. Las concentraciones fueron:

**Tabla 5.4 - Calibrado con los cationes**

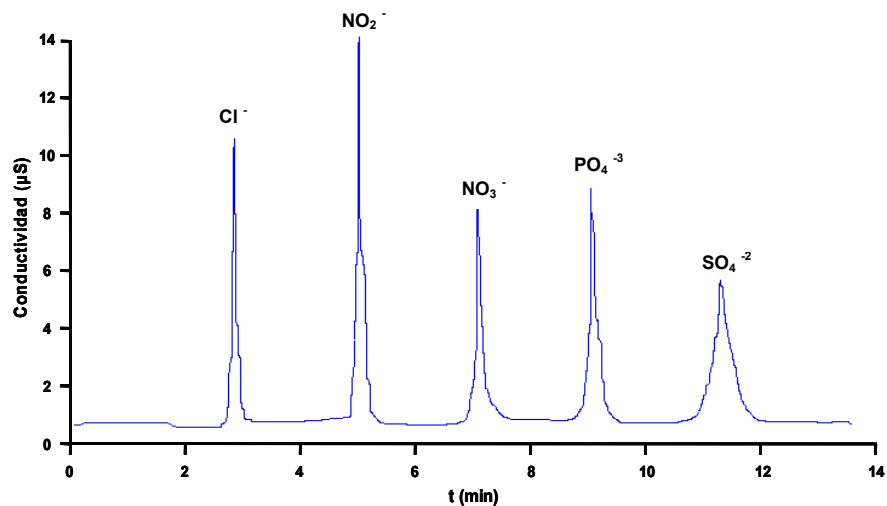
Concentraciones ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
$\text{Na}^+$	[5.0; 20.0]
$\text{NH}_4^+$	[1.0; 5.0]
$\text{K}^+$	[2.0; 5.0]
$\text{Ca}^{+2}$	[5.0; 20.0]
$\text{Mg}^{+2}$	[5.0; 20.0]

Tanto en la calibración de los aniones como la de los cationes, las

disoluciones patrones empleadas se prepararon con agua destilada, diluyendo disoluciones acuosas de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloruros, nitritos, nitratos, fosfatos, sulfatos, sodio, amonio, potasio, calcio y magnesio. Una vez preparadas las disoluciones patrón, se inyectaron en el sistema de análisis para su calibración. Este proceso se ha repetido a cada 20 determinaciones y siempre cuando hubo un cambio de ajuste del detector o algún cambio en el sistema.

Para determinar el pH y la conductividad eléctrica del agua, esto se hizo con auxilio de un pH-metro *WTW* (pH 196) y con un conductímetro *WTW* (LF 537), respectivamente.

En la **Figura 5.3** se muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras.



**Figura 5.3** - Cromatograma de determinación de los aniones

A continuación se muestran los resultados obtenidos.



Tabla 5.5 - Características del agua de pozo

Características			
Cl <sup>-</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	23.60	Na <sup>+</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	26.25
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	23.40	K <sup>+</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	6.00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	60.60	Ca <sup>+2</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	45.00
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	43.60	Mg <sup>+2</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	4.42
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	95.00	Al <sup>+3</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	0.02
SiO <sub>2</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	12.22	Fe <sup>+3</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	0.13
pH	7.53	Conductividad (μS)	1026

### 3 - ESTUDIO DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DEL LAS EN LABORATORIO

Se han establecido las *cinéticas* e *isotermas* de adsorción de cada uno de los homólogos de una mezcla comercial de LAS. Tanto para las experiencias en discontinuo como para las realizadas en columna, las disoluciones del analito estudiado se prepararon con agua desionizada, para evitar fenómenos de competencia, que podrían alterar las capacidades de adsorción de cada homólogo.

#### 3.1 - Experiencia en discontinuo (tanque)

La técnica utilizada para la realización de estos experimentos se denomina en tanque discontinuo o "*batch*" y se basa en la agitación y mezcla con el suelo, a temperatura constante, de disoluciones de diferentes concentraciones del analito estudiado, con el fin de evaluar la cantidad del analito retenida en el suelo. Posteriormente se separan por centrifugación

las fases líquida y sólida, y se determina por cromatografía líquida la concentración de las distintas especies en disolución, calculando mediante un balance de materia la que corresponde a la fase sólida.

Se han realizado experiencias previas para evaluar la influencia de una serie de parámetros característicos, como son: relación suelo/disolución, determinación del tiempo de equilibrio (cinéticas de adsorción y desorción) y el pH.

La mezcla estándar de *LAS* utilizada posee la siguiente distribución de homólogos:

<i>LAS</i> - C <sub>10</sub> : 11.1%	<i>LAS</i> - C <sub>11</sub> : 38.7%
<i>LAS</i> - C <sub>12</sub> : 31.2%	<i>LAS</i> - C <sub>13</sub> : 19.0%

Las experiencias se han realizado a 20 °C, con objeto de operar en las proximidades de la temperatura ambiente.

#### **A) Relación suelo/disolución**

La selección de una relación suelo/disolución es básica para el desarrollo de los estudios de adsorción, dependiendo del coeficiente de distribución  $K_d$ . Si esta relación es demasiado elevada, se corre el riesgo de que la sustancia en estudio quede fuertemente retenida y se dificulte su determinación y cuantificación posterior. Por el contrario, si la relación es demasiado baja, se podrían modificar las condiciones físico-químicas del suelo en estudio al producirse fenómenos de intercambio iónico que alteran la superficie de las partículas del suelo.

La relación suelo/disolución óptima puede determinarse teóricamente mediante el uso de modelos basados en el coeficiente de distribución  $K_d$ , que a su vez puede ser predicho gracias a técnicas de estimación basadas en el coeficiente de distribución en n-octano ( $P_{ow}$ )<sup>5</sup>, sin embargo resulta más conveniente determinar esta relación experimentalmente ya que estos modelos no se pueden extrapolar de manera general a todo tipo de suelos y sustancias.

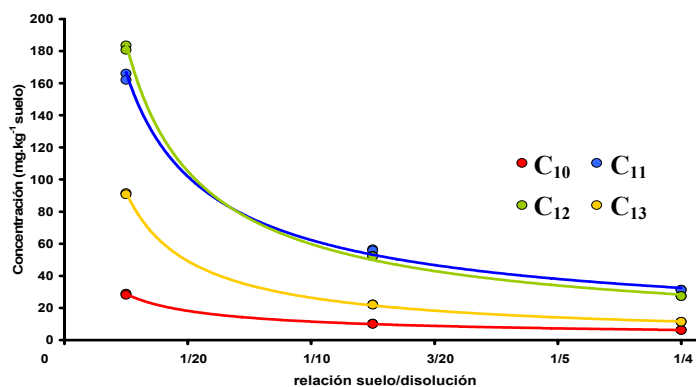
El procedimiento operatorio en este estudio fue el siguiente: se puso en contacto diferentes cantidades de suelo (0.5; 2.5; 5.0 gramos) con 20 mL de disolución del analito a una concentración de 20.0 mg·L<sup>-1</sup> en frascos de polipropileno de 80 mL. Estos frascos se sometieron a agitación rotatoria mediante un dispositivo que mantenía la velocidad adecuada que aseguraba la homogeneidad de la suspensión, evitando el apelmazamiento del suelo en el extremo del frasco. La temperatura se mantuvo constante a 20 °C.

La concentración de LAS adsorbido por el sustrato sólido se determinó de forma *indirecta*. Por ello después de cada agitación, se cuantificó la cantidad de analito en la disolución sobrenadante, aceptando que la diferencia existente entre la cantidad de LAS original de la disolución puesta en contacto con el suelo y la cantidad de LAS del líquido sobrenadante era la cantidad de sustancia adsorbida por el suelo y por el material utilizado en la experiencia; en este caso se despreciaron otros posibles efectos como precipitación (debido al Ca<sup>+2</sup> del suelo), bio y/o fotodegradación, etc., que pudiesen hacer disminuir la cantidad de LAS observada. Para tener en cuenta este aspecto se agitó durante un tiempo suficientemente alto, una disolución control de 20 mg·L<sup>-1</sup> de analito en las mismas condiciones pero sin suelo.

---

<sup>5</sup> OECD Guideline for the testing of Chemicals. *Determination of soil adsorption/desorption, using a batch equilibrium method*, test nº 106, 2000

En la siguiente gráfica se muestran los resultados obtenidos. En ella se puede observar la cantidad de adsorbida de cada homólogo de LAS, expresada en  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de suelo, en función de la relación suelo/disolución aplicada en cada caso.



**Figura 5.4** - Concentración de los diferentes homólogos del LAS adsorbida en función de la relación suelo/disolución

Como situación de compromiso se seleccionó la relación 1/8 (2.5 gramos de suelo y 20 mL de disolución de concentración adecuada), ya que permite una cuantificación adecuada y los fenómenos de intercambio iónico resultan minimizados.

## B) Determinación del tiempo de equilibrio (Cinética de adsorción)

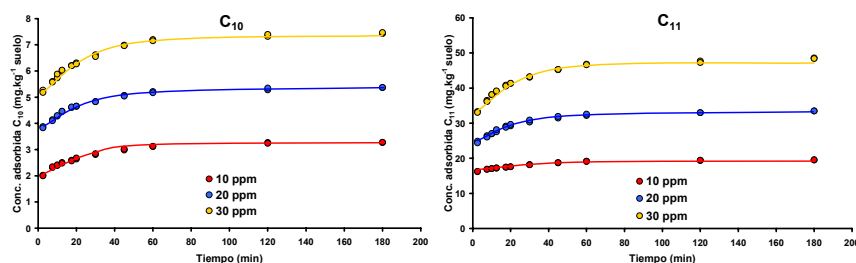
Con el objetivo de determinar el tiempo mínimo necesario para alcanzar el equilibrio en la suspensión suelo/disolución, se prepararon una serie de frascos de polipropileno con capacidad volumétrica de 80 mL, debidamente etiquetados, en cada uno de los cuales se introdujo 2.5 g de suelo y se añadieron 20 mL de disolución acuosa de la concentración elegida de LAS. Después de agitar los frascos, en un agitador giratorio orbital a 150 rpm, y a temperatura de 20 °C durante distintos tiempos (2.5;

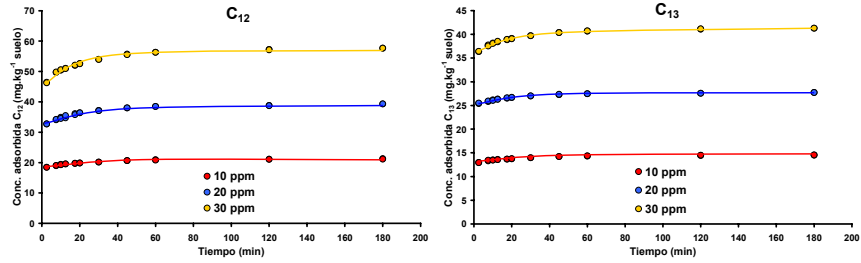
7.5; 10.0; 12.5; 20.0; 30.0; 45.0; 60.0; 120.0; 180.0 min), se separó la fase sólida de la líquida, por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, donde fue recogida parte de la fracción líquida (1.0 mL), que posteriormente fue diluida con 1.0 mL de patrón interno para su análisis por *HPLC/FLD*. Para cada punto experimental se realizó una réplica. Las experiencias de equilibrio se realizaron a tres concentraciones distintas (10.0; 20.0; 30.0 mg·L<sup>-1</sup> de una mezcla comercial de *LAS*). A continuación, en la **Tabla 5.6**, se muestran las condiciones empleadas para este estudio.

**Tabla 5.6** - Condiciones de para el estudio de cinética de adsorción

Soluto	Relación Suelo Disolución	Concentración inicial LAS total (mg·L <sup>-1</sup> )	Tiempo de agitación (min)
LAS comercial	1/8	10.0	[2.5; 7.5; 10.0; 12.5;
		20.0	20.0; 30.0; 45.0; 60.0;
		30.0	120.0; 180.0]

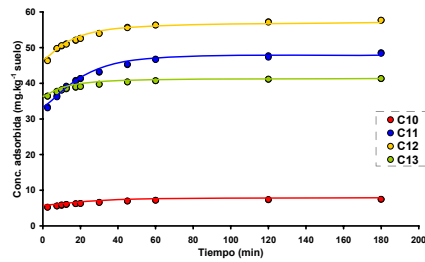
De esta forma se obtuvieron las curvas que muestran la evolución de la cantidad adsorbida de cada homólogo por unidad de masa de suelo frente al tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.5**. Su estudio permitió determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre el suelo y la disolución empleada.





**Figura 5.5** - Cinética de adsorción para los homólogos del LAS a diferentes concentraciones estudiadas

En la **Figura 5.6** se muestra la cinética de adsorción para cada homólogo a una concentración inicial de 30.0 mg·L<sup>-1</sup>. En ella puede observarse que el equilibrio se alcanza a partir de 60 minutos.



**Figura 5.6** - Cinética de adsorción para los homólogos del LAS a una concentración de 30 mg·L<sup>-1</sup>

El modelo matemático que puede usarse para un adecuado ajuste a este tipo de funciones hiperbólicas es el siguiente:

$$X = \frac{X_{\max} \cdot t}{B + t} \tag{5.13}$$

ó en su forma lineal:

$$\frac{1}{X} = \frac{B}{X_{\max} \cdot t} + \frac{1}{X_{\max}} \tag{5.14}$$

basándose en esta expresión,  $X$  representa la cantidad de *LAS* adsorbida ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  suelo) a un tiempo determinado  $t$  (min),  $B$  es una constante y  $X_{\text{max}}$  es la cantidad máxima de sustancia adsorbida por el sólido en estudio cuando transcurre un tiempo infinito; esta cantidad puede determinarse gracias a la ordenada en el origen de la expresión lineal de esta ecuación<sup>6</sup>. Los resultados obtenidos para este parámetro se muestran en la **Tabla 5.7**.

**Tabla 5.7 - Cantidad máxima de *LAS* adsorbida por el suelo**

	$X_{\text{max}}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suelo)		
	10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	20.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	30.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
<b>C<sub>10</sub></b>	3.27	5.37	7.45
<b>C<sub>11</sub></b>	19.55	33.48	48.49
<b>C<sub>12</sub></b>	21.24	39.33	57.68
<b>C<sub>13</sub></b>	14.54	27.75	41.31

Se puede observar tras el análisis de las representaciones gráficas de las cinéticas, que la adsorción del tensioactivo es inicialmente rápida, produciéndose en los primeros minutos de contacto entre suelo y disolución. La cantidad de *LAS* degradada durante este tiempo es despreciable como indicó el experimento de *LAS* en agua desionizada, sin la adicción de suelo. Para los siguientes experimentos se tomó como tiempo suficiente para asegurar el establecimiento del equilibrio un valor de 2 horas.

<sup>6</sup> Romero E., Dios G., Peña A., Sánchez-Raseo F., *Methods for the determination of pesticide adsorption on soils and their constituents*. En: Pesticide/Soil Interactions. Some current research methods. Ed. Cornejo J., Jamet P., P. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Paris, Francia, pp. 197-205, 2000

### C) Cinética de desorción

De forma similar se estableció el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en el proceso de desorción del analito previamente adsorbido al suelo. Para ello se utilizaron los sedimentos de suelo provenientes del experimento anterior, en los cuales se añadía 20 mL de agua destilada Milli-Q y se agitaba mecánicamente los frascos, con un agitador giratorio orbital a 150 rpm, y a temperatura de 20 °C durante distintos tiempos (2.5; 7.5; 10.0; 12.5; 17.5; 20.0; 30.0; 45.0; 60.0; 120.0; 240.0; 480.0; 1440.0 min) con la finalidad de desorber el analito del suelo. A continuación se separó la fase sólida de la líquida, por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, donde fue recogida parte de la fracción líquida (1.0 mL), que posteriormente fue diluida con 1.0 mL de patrón interno para su análisis por *HPLC/FLD*. Para cada punto experimental se realizó una réplica. A continuación se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

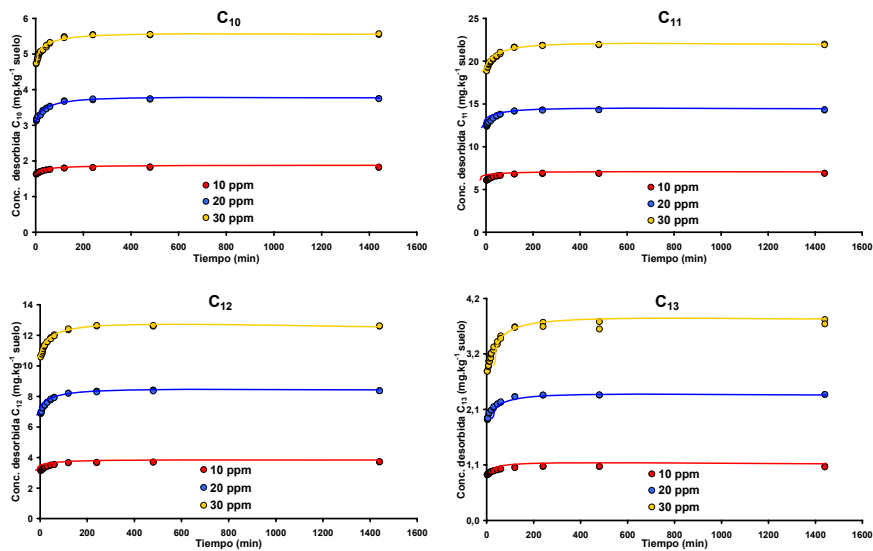
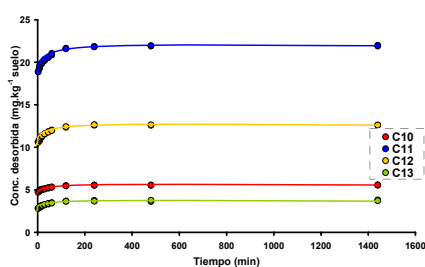


Figura 5.7 - Cinética de desorción para los homólogos del LAS



En la **Figura 5.8** se muestran las cinéticas de desorción para cada homólogo utilizando una concentración inicial de  $30.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En ella se puede observar que el equilibrio de desorción se alcanza a partir de 200 minutos para todos los homólogos.



**Figura 5.8** - Cinética de desorción para los homólogos del LAS a una concentración de  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

El análisis de los datos obtenidos, permitió calcular la cantidad máxima de cada homólogo que se podría desorber, bajo estas condiciones, encontrándose los siguientes valores:

**Tabla 5.8** - Cantidad máxima de LAS desorbida del suelo

	$X_{\max} (\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ suelo})$		
	$10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$30.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
C <sub>10</sub>	1.82	3.75	5.56
C <sub>11</sub>	6.9	14.32	21.96
C <sub>12</sub>	3.72	8.37	12.61
C <sub>13</sub>	1.02	2.38	3.76

De la observación de las representaciones gráficas de las cinéticas obtenidas, se puede concluir que la desorción del LAS es un fenómeno

más lento que su adsorción. Asimismo se pone de manifiesto que la capacidad de adsorción es elevada, incrementándose con la longitud de la cadena del homólogo (a mayor hidrofobicidad, mayor retención en el suelo). Para los siguientes experimentos se tomó como tiempo suficiente para el establecimiento del equilibrio de desorción un valor de 4 horas.

#### D) Control del pH

El proceso de adsorción está fuertemente condicionado por el pH, como consecuencia de que la carga de la materia orgánica y las arcillas del suelo dependen de él. En las experiencias realizadas se ha medido el pH en el tiempo inicial ( $t_0$ ) y al elegido como tiempo de equilibrio ( $t_{120}$  para la adsorción y  $t_{240}$  para la desorción) de las mezclas suelo/disolución estudiadas (con contenido de 10.0; 20.0; 30.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total). En la **Tabla 5.9** se recogen los valores de pH medidos. Puede observarse que no existió una variación significativa durante el transcurso de las experiencias realizadas.

**Tabla 5.9** - pH de las disoluciones y mezclas analizadas para el estudio de adsorción y desorción

LAS 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH: 5.71	LAS 30.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH: 5.78
LAS 20.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH: 5.73	Agua Milli-Q	pH: 5.84
LAS 10 ppm y suelo - $t_0$	pH: 7.96	LAS 10 ppm y suelo - $t_{120}$	pH: 8.05
LAS 20 ppm y suelo - $t_0$	pH: 7.99	LAS 20 ppm y suelo - $t_{120}$	pH: 8.06
LAS 30 ppm y suelo - $t_0$	pH: 8.00	LAS 30 ppm y suelo - $t_{120}$	pH: 8.07
H <sub>2</sub> O Milli-Q (10) y suelo - $t_0$	pH: 8.12	H <sub>2</sub> O Milli-Q (10) y suelo - $t_{240}$	pH: 8.13
H <sub>2</sub> O Milli-Q (20) y suelo - $t_0$	pH: 8.14	H <sub>2</sub> O Milli-Q (20) y suelo - $t_{240}$	pH: 8.14
H <sub>2</sub> O Milli-Q (30) y suelo - $t_0$	pH: 8.17	H <sub>2</sub> O Milli-Q (30) y suelo - $t_{240}$	pH: 8.16

### E ) Isotermas de adsorción

Una vez establecidos la relación suelo/disolución y el tiempo de agitación necesario para alcanzar el equilibrio, se procedió a establecer los modelos correspondientes a las isotermas de adsorción para los diferentes homólogos del LAS. Con esta finalidad, a una temperatura de 20 °C, se agitó una cantidad determinada de suelo (2.5 g) con un volumen de disolución (20.0 mL) de la concentración elegida. Se ensayaron concentraciones crecientes del analito (5.0; 7.5; 10.0; 15.0; 20.0; 25.0; 30.0; 35.0; 45.0 mg·L<sup>-1</sup>), en frascos de polipropileno de 80 mL de capacidad, etiquetados convenientemente. Transcurrido el tiempo fijado (2 horas) para alcanzar el equilibrio, se separaron por centrifugación (4000 rpm por 10 minutos) las fracciones sólida y líquida. Parte de la fracción líquida (1.0 mL) fue recogida y, posteriormente, diluida con 1.0 mL de patrón interno para su análisis por HPLC/FLD. Para cada punto experimental se obtuvo una réplica. A continuación, en la **Tabla 5.10** se resumen las condiciones empleadas para este estudio:

**Tabla 5.10** - Condiciones para el estudio de la isoterma de adsorción

Soluto	Relación Suelo Disolución	Tiempo de agitación (min)	Concentración inicial LAS total (mg·L <sup>-1</sup> )
LAS comercial	1/8	120	[5.0; 7.5; 10.0;
C <sub>10</sub>			15.0; 20.0; 25.0;
C <sub>11</sub>			30.0; 35.0; 45.0]
C <sub>12</sub>			
C <sub>13</sub>			

A partir de los resultados obtenidos, se efectúa el tratamiento de los datos,

y de manera general, el cálculo para establecer el balance de materia a cada uno de los homólogos del LAS por medio de la determinación de  $X$  (cantidad del soluto retenido en el suelo, expresado por  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y de  $C_e$  (concentración en equilibrio en la disolución, expresado por  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

A continuación se realiza la representación de  $X$  frente a  $C_e$ . De los modelos posibles, se ha seleccionado el propuesto por Freundlich que responde a la adsorción de un soluto en disolución sobre un adsorbente sólido. Este modelo se rige mediante la ecuación:

$$X = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (5.15)$$

o en su forma lineal: 
$$\text{Log } X = \text{Log } K_f + \frac{1}{n} \cdot \text{Log } C_e \quad (5.16)$$

donde  $X$  representa la cantidad de LAS adsorbida por el suelo en estudio una vez alcanzado el equilibrio,  $C_e$  es la concentración de equilibrio de LAS en la disolución,  $K_f$  y  $n$  son dos constantes que dependen de la naturaleza de la sustancia en estudio, suelo y temperatura. El parámetro  $1/n$  puede indicar el tipo de isoterma que mejor responde al comportamiento de la sustancia en estudio<sup>7</sup>, así si  $1/n$  tiene un valor menor a 1, la isoterma presenta una forma cóncava respecto al eje de abscisas (isoterma tipo L) indicando que el suelo tiene mayor afinidad por el soluto que por el disolvente (agua) a bajas concentraciones de equilibrio y menor afinidad por el soluto que por el disolvente a altas concentraciones, cuando empiezan a saturarse los lugares específicos de

---

<sup>7</sup> Giles C.H., Macevan T.H., Nakhwa, S.N., Smith D., (1960). *Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanism and measurements of specific surface area of solids*. J. Chem. Soc. 111; 3973- 3993, 1960

adsorción de la superficie del adsorbente.  $K_f$  se puede relacionar con la constante de distribución  $K_d$  de cada homólogo entre suelo y disolución gracias a la expresión:

$$K_d = K_f \cdot C_e^{\frac{1-n}{n}} \quad (5.17)$$

En esta expresión se tiene en cuenta el cambio que experimenta el valor de  $K_d$  a medida que varía la concentración de equilibrio de la disolución sobrenadante debido a la saturación de sitios vacantes descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5.11** y en la **Figura 5.9**:

**Tabla 5.11** - Datos relacionados con la isoterma de adsorción para cada homólogo

Isoterma de Adsorción									
$C_{10}$					$C_{11}$				
$C_o^*$	$C_e$	X	Log $C_e$	Log X	$C_o^*$	$C_e$	X	Log $C_e$	Log X
0.555	0.286	2.152	-0.544	0.333	1.935	0.572	10.903	-0.243	1.038
0.555	0.292	2.103	-0.534	0.323	1.935	0.572	10.900	-0.242	1.037
0.833	0.454	3.027	-0.343	0.481	2.903	0.864	16.306	-0.063	1.212
0.833	0.460	2.981	-0.337	0.474	2.903	0.880	16.178	-0.055	1.209
1.110	0.624	3.888	-0.205	0.590	3.870	1.181	21.513	0.072	1.333
1.110	0.627	3.868	-0.203	0.587	3.870	1.178	21.535	0.071	1.333
1.665	0.990	5.403	-0.005	0.733	5.805	1.959	30.765	0.292	1.488
1.665	1.010	5.243	0.004	0.720	5.805	1.950	30.841	0.290	1.489
2.220	1.455	6.116	0.163	0.786	7.740	2.955	38.283	0.470	1.583
2.220	1.451	6.151	0.162	0.789	7.740	2.935	38.442	0.468	1.585
2.775	1.824	7.605	0.261	0.881	9.675	3.619	48.445	0.559	1.685

Tabla 5.11 - Continuación

C <sub>10</sub>					C <sub>11</sub>				
C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X	C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X
2.775	1.866	7.271	0.271	0.862	9.675	3.756	47.354	0.575	1.675
3.330	2.255	8.603	0.353	0.935	11.610	4.659	55.612	0.668	1.745
3.330	2.188	9.138	0.340	0.961	11.610	4.515	56.762	0.655	1.754
3.885	2.627	10.060	0.420	1.003	13.545	5.505	64.323	0.741	1.808
3.885	2.654	9.851	0.424	0.993	13.545	5.643	63.218	0.751	1.801
4.995	3.463	12.257	0.539	1.088	17.415	7.160	82.037	0.855	1.914
4.995	3.428	12.539	0.535	1.098	17.415	7.148	82.139	0.854	1.915
C <sub>12</sub>					C <sub>13</sub>				
C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X	C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X
1.560	0.204	10.852	-0.691	1.036	0.950	0.056	7.155	-1.255	0.855
1.560	0.202	10.861	-0.694	1.036	0.950	0.059	7.125	-1.226	0.853
2.340	0.304	16.290	-0.517	1.212	1.425	0.070	10.838	-1.154	1.035
2.340	0.344	15.970	-0.464	1.203	1.425	0.073	10.814	-1.135	1.034
3.120	0.450	21.361	-0.347	1.330	1.900	0.114	14.288	-0.943	1.155
3.120	0.454	21.326	-0.343	1.329	1.900	0.119	14.249	-0.925	1.154
4.680	0.771	31.269	-0.113	1.495	2.850	0.187	21.302	-0.728	1.328
4.680	0.760	31.362	-0.119	1.496	2.850	0.184	21.326	-0.735	1.329
6.240	1.181	40.473	0.072	1.607	3.800	0.281	28.148	-0.551	1.449
6.240	1.099	41.124	0.041	1.614	3.800	0.283	28.136	-0.548	1.449
7.800	1.483	50.538	0.171	1.704	4.750	0.372	35.028	-0.430	1.544
7.800	1.498	50.419	0.175	1.703	4.750	0.381	34.950	-0.419	1.543
9.360	1.822	60.300	0.261	1.780	5.700	0.461	41.913	-0.336	1.622
9.360	1.793	60.533	0.254	1.782	5.700	0.459	41.928	-0.338	1.623
10.920	2.317	68.825	0.365	1.838	6.650	0.545	48.840	-0.264	1.689
10.920	2.256	69.310	0.353	1.841	6.650	0.553	48.780	-0.258	1.688
14.040	2.905	89.082	0.463	1.950	8.550	0.738	62.493	-0.132	1.796
14.040	2.976	88.509	0.474	1.947	8.550	0.759	62.329	-0.120	1.795

\* Donde C<sub>0</sub> representa la concentración inicialmente puesta

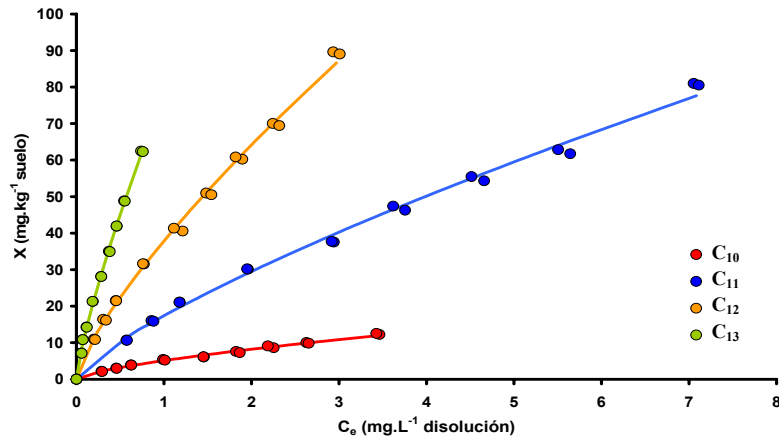


Figura 5.9 - Isotermas de adsorción para cada homólogo del LAS

A continuación en la **Figura 5.10**, se muestra la representación logarítmica de los datos anteriores. De su observación se puede concluir que responden bastante bien al modelo descrito por la isoterma de Freundlich (los coeficientes de determinación,  $R^2$ , en todos los casos son mayores que 99.22% indicando un buen ajuste lineal para todos los homólogos).

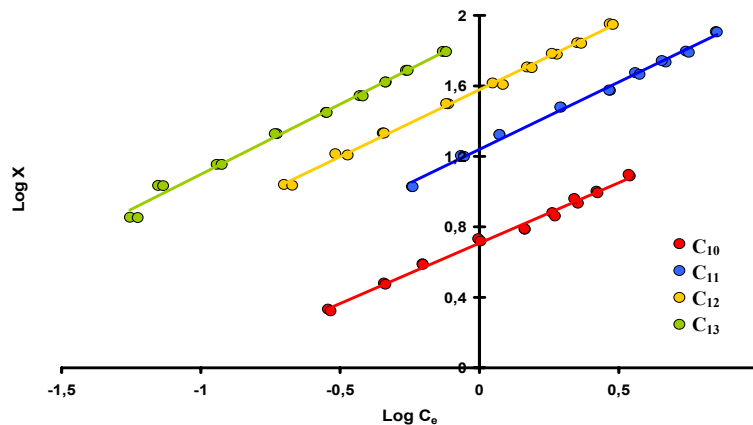


Figura 5.10 - Isotermas de adsorción para los homólogos del LAS

En la **Tabla 5.12** se muestran, de manera resumida, los parámetros experimentales calculados a partir de las representaciones anteriores expuestas:

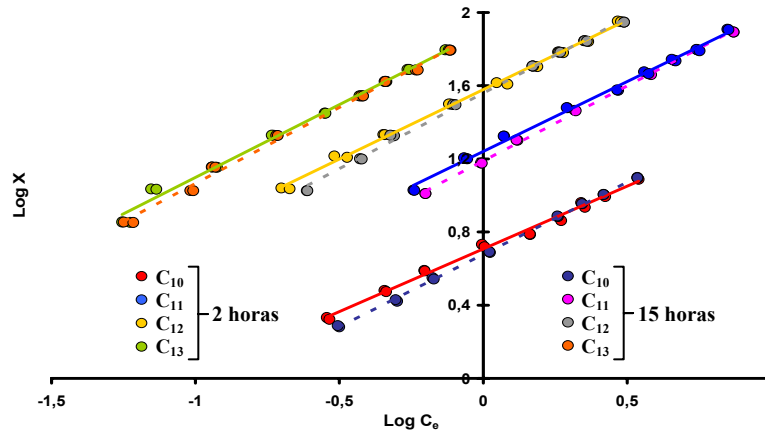
**Tabla 5.12** - *Parámetros característicos de las isotermas de adsorción de los diferentes homólogos de la mezcla comercial de LAS*

	$K_f$	$1/n$	$R^2$ (%)
$C_{10}$	5.11	0.69	99.36
$C_{11}$	17.73	0.76	99.54
$C_{12}$	37.85	0.76	99.74
$C_{13}$	78.32	0.80	99.22

El valor del parámetro  $1/n$  indica que todos los homólogos siguen una isoterma tipo L, ya que en todos ellos se tiene un valor inferior a 1. Por otra parte, al tener los diferentes homólogos valores de  $1/n$  parecidos, se pueden comparar los correspondientes valores de las constantes de Freundlich. Se puede observar como este valor aumenta a medida que lo hace la longitud de la cadena alquílica para cada homólogo, corroborándose así que aquellos homólogos de cadena más larga (y por tanto con un mayor carácter hidrofóbico) son más fuertemente retenidos por el suelo.

Asimismo, y con objeto de comprobar que el tiempo de equilibrio seleccionado (2 horas) era suficiente, se realizó una experiencia empleando un tiempo de equilibrio de 15 horas. Los resultados, una vez linealizados, se representan en la **Figura 5.11**.





**Figura 5.11** - Isoterma de adsorción para los homólogos del LAS en diferentes tiempos

Una vez analizados, se puede concluir que se no se encuentran diferencias significativas entre ellos, por lo que el tiempo de equilibrio de dos horas resulta adecuado para la realización de las experiencias.

#### F) Isotermas de desorción

Para realizar las experiencias de desorción se partió de un suelo que ya había alcanzado previamente el equilibrio de adsorción.

Para ello, se utilizaron los sedimentos de suelo provenientes del experimento anterior, a los que se añadían 20 mL de agua Milli-Q y se agitaban mecánicamente en los frascos, con un agitador giratorio orbital a 150 rpm, y a temperatura de 20 °C durante un tiempo de 4 horas, con la finalidad de desorber el analito del suelo. A continuación se separaba la fase sólida de la líquida, por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, donde fue recogida parte de la fracción líquida (1.0 mL), que posteriormente fue diluida con 1.0 mL de patrón interno para su posterior análisis por *HPLC/FLD*. Para cada punto experimental fue realizada una

réplica. A continuación en la **Tabla 5.13** y en la **Figura 5.12** se recogen, los resultados obtenidos.

**Tabla 5.13 - Datos relacionados con la isoterma de desorción para cada homólogo**

Isoterma de Desorción									
C <sub>10</sub>					C <sub>11</sub>				
C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X	C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X
1.911	0.139	0.802	-0.858	-0.096	10.229	04.96	6.259	-0.304	0.797
1.943	0.136	0.852	-0.865	-0.070	10.232	0.495	6.270	-0.305	0.797
2.641	0.198	1.059	-0.704	0.025	15.047	0.729	9.215	-0.137	0.965
2.693	0.200	1.094	-0.699	0.039	14.990	0.721	9.224	-0.142	0.965
3.551	0.275	1.350	-0.561	0.130	20.015	0.956	12.370	-0.020	1.092
3.493	0.273	1.307	-0.563	0.116	20.100	0.957	12.443	-0.019	1.095
4.874	0.395	1.715	-0.403	0.234	29.166	1.436	17.678	0.157	1.247
4.921	0.395	1.761	-0.403	0.246	29.038	1.420	17.678	0.152	1.247
6.116	0.506	2.068	-0.296	0.316	37.549	1.884	22.474	0.275	1.352
6.151	0.503	2.129	-0.299	0.328	37.736	1.889	22.624	0.276	1.355
7.660	0.648	2.477	-0.188	0.394	46.269	2.293	27.927	0.360	1.446
7.716	0.650	2.517	-0.187	0.401	45.708	2.267	27.570	0.355	1.440
8.984	0.763	2.879	-0.117	0.459	54.669	2.728	32.848	0.436	1.517
9.022	0.771	2.853	-0.113	0.455	54.705	2.720	32.947	0.435	1.518
10.133	0.868	3.192	-0.062	0.504	62.661	3.256	36.613	0.513	1.564
10.121	0.868	3.180	-0.062	0.502	62.244	3.264	36.131	0.514	1.558
12.437	1.099	3.643	0.041	0.561	78.106	4.156	44.861	0.619	1.652
12.489	1.103	3.663	0.043	0.564	78.171	4.169	44.822	0.620	1.651
C <sub>12</sub>					C <sub>13</sub>				
C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X	C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X
10.617	0.271	8.445	-0.566	0.927	7.149	0.084	6.474	-1.074	0.811
10.608	0.276	8.402	-0.559	0.924	7.113	0.081	6.468	-1.093	0.811
15.866	0.389	12.756	-0.410	1.106	10.632	0.115	9.708	-0.938	0.987

Tabla 5.13 - Continuación

C <sub>12</sub>					C <sub>13</sub>				
C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X	C <sub>0</sub> *	C <sub>e</sub>	X	Log C <sub>e</sub>	Log X
15.823	0.385	12.744	-0.415	1.105	10.614	0.118	9.666	-0.926	0.985
21.215	0.501	17.206	-0.300	1.236	14.285	0.144	13.131	-0.841	1.118
21.331	0.504	17.296	-0.297	1.238	14.261	0.143	13.119	-0.845	1.118
31.411	0.785	25.132	-0.105	1.400	21.272	0.230	19.430	-0.638	1.288
31.286	0.765	25.164	-0.116	1.401	21.254	0.231	19.403	-0.636	1.288
40.567	1.065	32.050	0.027	1.506	28.148	0.321	25.577	-0.493	1.408
41.360	1.061	32.870	0.026	1.517	28.136	0.322	25.559	-0.492	1.408
50.911	1.296	40.546	0.112	1.608	34.989	0.394	31.834	-0.404	1.503
50.972	1.296	40.601	0.113	1.609	34.938	0.392	31.798	-0.406	1.502
60.750	1.563	48.246	0.194	1.683	41.964	0.478	38.142	-0.321	1.581
60.590	1.573	48.007	0.197	1.681	41.943	0.482	38.085	-0.317	1.581
69.987	1.927	54.573	0.285	1.737	48.535	0.587	43.842	-0.232	1.642
69.647	1.932	54.190	0.286	1.734	48.463	0.585	43.783	-0.233	1.641
88.447	2.520	68.287	0.401	1.834	62.239	0.779	56.009	-0.109	1.748
88.435	2.511	68.345	0.400	1.835	62.272	0.785	55.989	-0.105	1.748

\* Donde C<sub>0</sub> representa la concentración adsorbida anteriormente

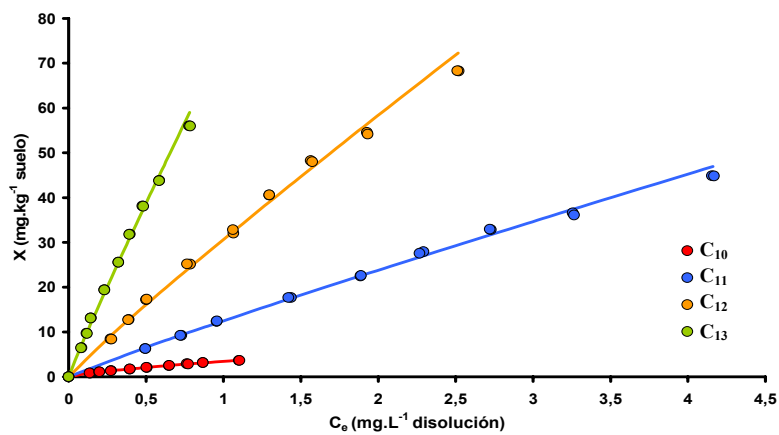
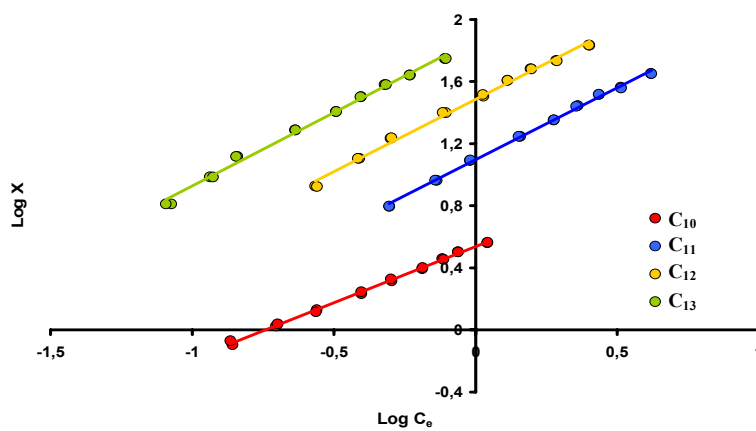


Figura 5.12 - Isotermas de desorción para cada homólogo del LAS

A continuación en la **Figura 5.13**, se muestra la representación logarítmica de los datos anteriores. De su observación se puede concluir que responden bastante bien al modelo descrito por la isoterma de Freundlich (los coeficientes de determinación,  $R^2$ , en todos los casos son mayores que 99.42% indicando un buen ajuste lineal para todos los homólogos).



**Figura 5.13** - Isotermas de desorción para los homólogos del LAS

En la **Tabla 5.14** se muestran de manera resumida los parámetros experimentales calculados a partir de las representaciones anteriores.

**Tabla 5.14** - Parámetros característicos de las isotermas de desorción de los diferentes homólogos de la mezcla comercial de LAS

	$K_f$	$1/n$	$R^2$ (%)
$C_{10}$	3.45	0.72	99.83
$C_{11}$	12.50	0.93	99.76
$C_{12}$	30.65	0.93	99.47
$C_{13}$	74.47	0.94	99.42

## G ) Discusión de los resultados

Los resultados obtenidos en las experiencias de adsorción/desorción realizadas en forma discontinua, resultan concordantes con los obtenidos por Matthijs & de Henau<sup>8</sup> (1985), en lo que se refiere a la rapidez con que tiene lugar el proceso de adsorción. Posiblemente este mecanismo esté basado predominantemente en interacciones hidrófobas y/o apolares entre el analito y los componentes del suelo, como sugieren Hand & Williams<sup>9</sup> (1987), House & Farr<sup>10</sup> (1989), Marchesi<sup>11</sup> *et al.* (1991), Traina<sup>12</sup> *et al.* (1996). Otros como Brownawell<sup>13</sup> *et al.* (1991), Westall<sup>14</sup> *et al.* (1999) lo atribuyen a una mezcla de interacciones apolares e interacciones químicas específicas y/o electrostáticas. Por medio de estos dos tipos de interacciones, se puede justificar el hecho de que al aumentar la longitud de la cadena alquílica de los componentes del LAS, se observe una mayor adsorción (verificada por un aumento del valor de  $K_f$  del homólogo C<sub>10</sub> al C<sub>13</sub>), ya que la hidrofobicidad de la molécula aumenta haciendo que la carga negativa del grupo sulfonato presente un impacto menor en estas interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones podrían tener lugar entre los analitos y la materia orgánica presente en el suelo

<sup>8</sup> Matthijs E., de Henau H., *Adsorption and desorption of LAS*. Tenside Surf. Det. 22; 299-304, 1985

<sup>9</sup> Hand V.C., Williams G.K., *Structure-activity relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates*. Environ. Sci. Technol. 21; 370-373, 1987

<sup>10</sup> House W.A., Farr I.S., *Adsorption of sulfonates from detergents mixtures on potassium kaolinite*. Colloid. Surf. 40; 167-180, 1989

<sup>11</sup> Marchesi J.R., House W.A., White G.F., Russell N.J., Farr I.S., *A comparative study of the adsorption of linear alkyl sulphates and alkylbenzene sulphonates on river sediments*. Colloid. Surf. 53; 63-78, 1991

<sup>12</sup> Traina S.J., McAvoy D.C., Versteeg D.J., *Association of linear alkylbenzene sulfonates with dissolved humic substances and its effect on bioavailability*. Environ. Sci. Technol. 30; 1300-1309, 1996

<sup>13</sup> Brownawell B.J., Chen H., Zhang W., Westall J.C., *Adsorption of surfactants*. In: Baker R.A. (ed.), *Organic Substances and Sediments in Water: Processes and Analytical*, Lewis Publishers, Chelsea (Michigan), U.K., pp. 127-147, 1991

<sup>14</sup> Westall J.C., Chen H., Zhang W., Brownawell B.J., *Sorption of linear alkylbenzene sulfonates on sediment materials*. Environ. Sci. Technol. 33; 3110-3118, 1999

como indican Murti<sup>15</sup> *et al.* (1966), Urano<sup>16</sup> *et al.* (1984), Matthijs & de Henau<sup>8</sup> (1985), McAvoy<sup>17</sup> *et al.* (1994), Fytianos<sup>18</sup> *et al.* (1998), o con el limo, que es elevado en este tipo de suelo, como cita Hand & Williams<sup>9</sup> (1987). Asimismo, también es posible que los analitos interaccionen con los iones de hierro presentes como cita Inoue<sup>19</sup> *et al.* (1978), Balzer & Lange<sup>20</sup> (1979) y Litz<sup>21</sup> *et al.* (1987). Este último autor justifica el elevado grado de adsorción del LAS al suelo, obteniendo valores de  $K_f > 10$ , por el alto contenido en iones de hierro y en humus (materia orgánica).

El hecho de que la intensidad de la adsorción del LAS aumente en función de la longitud de la cadena alquílica de cada uno de los homólogos, afecta a la proporción en que los mismos permanecen retenidos en el suelo. En este caso particular, se ha calculado la distribución porcentual para cada homólogo, una vez alcanzado el equilibrio suelo/disolución, tanto para la adsorción como para la desorción. La cantidad retenida en el suelo, se calculó por diferencia entre los valores adsorbidos y desorbidos. En la **Tabla 5.15** se muestran los valores medios porcentuales para cada homólogo, obtenidos a partir de los datos contenidos en las **Tablas 5.7** y **5.8**.

<sup>15</sup> Murti G.S., Volk V.V., Jackson M.L., *Soil adsorption of linear alkylate sulfonate*. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 30; 685-688, 1966

<sup>16</sup> Urano K., Saito M., Murata C., *Adsorption of surfactants on sediments*. Chemosphere 13; 293-300, 1984

<sup>17</sup> McAvoy D.C., Whik C.E., Moore B.L., Rapaport R.A., *Chemical fate and transport in a domestic septic system: sorption and transport of anionic and cationic surfactants*. Environ. Toxicol. Chem. 13, 213-221, 1994

<sup>18</sup> Fytianos K., Voudrias E., Papamichali A., *Behavior and fate of linear alkylbenzene sulfonate in different soils*. Chemosphere 36; 2741-2746, 1998

<sup>19</sup> Inoue K., Kaneko K., Yoshida M., *Adsorption of dodecylbenzene sulfonates by soil colloids and influence of soil colloids on their degradation*. Soil Sci. Plant Nutr. 24; 91-102, 1978

<sup>20</sup> Balzer D., Lange H., *Konkurrenzadsorption von Alkylbenzolsulfonaten und Polyanionen aus wässrigen Lösungen an Aluminiumoxid*. Colloid Poly. Sci. 257; 292-301, 1979

<sup>21</sup> Litz N., Doering H.W., Thiele M., Blume H.-P., *The behavior of linear alkylbenzenesulfonate in different soils: a comparison between field and laboratory studies*. Ecotoxic. Environ. Safety 14; 103-116, 1987

**Tabla 5.15** - Cambio en la distribución de los homólogos en el suelo

	Distribución de los homólogos de LAS (%)		
	LAS estándar	LAS adsorbido	LAS retenido
C <sub>10</sub>	11.10	5.15	2.34
C <sub>11</sub>	38.70	32.09	25.59
C <sub>12</sub>	31.20	36.87	39.85
C <sub>13</sub>	19.00	25.89	32.22

Por otra parte, la similitud de los valores calculados de  $K_f$  y  $1/n$  para los procesos de adsorción y desorción para cada homólogo, ponen de manifiesto la posibilidad de que se trate de procesos reversibles, como también señalan algunos autores como Hand & Williams<sup>9</sup> (1987), Siracusa & Somasundaran<sup>22</sup> (1987), House & Farr<sup>10</sup> (1989). El grado de reversibilidad puede ponerse de manifiesto a través del coeficiente de histéresis,  $H$ , (relación existente entre el valor de  $1/n$  en la adsorción y  $1/n$  obtenido en la experiencia de desorción). Los valores de  $H$  se encuentran recogidos en la **Tabla 5.16**.

**Tabla 5.16** - Valor del coeficiente de histéresis para cada homólogo

	Coeficiente de histéresis (H)
C <sub>10</sub>	0.96
C <sub>11</sub>	0.82
C <sub>12</sub>	0.82
C <sub>13</sub>	0.85

<sup>22</sup> Siracusa P.A., Somasundaran P., *Mechanism of hysteresis in sulfonate/kaolinite adsorption/desorption systems: Chromatographic separation of isomers*. J. Colloid Interface Sci., 120; 100-109, 1987

Como puede observarse en todos los homólogos este coeficiente es próximo a la unidad, indicando el alto grado de reversibilidad del proceso de adsorción/desorción.

### 3.2 - Experiencias en continuo (estudio con columna)

Mientras que en las experiencias en discontinuo se determina habitualmente el valor de los coeficientes de adsorción del suelo en condiciones de equilibrio, existen trabajos, como el de Miller<sup>23</sup> *et al.* (1989), que indican que, en muchas ocasiones, el tiempo de residencia de un soluto en una zona determinada del suelo no permite alcanzar dicho equilibrio, de manera que en múltiples ocasiones las condiciones de no-equilibrio rigen esencialmente los procesos de adsorción durante el transporte a través de la zona no saturada. Esto ha hecho que, en los últimos años, se tienda a la utilización de los procedimientos en flujo, pues proporcionan una mejor representación del transporte de los solutos en condiciones de campo. Griffioen<sup>24</sup> *et al.* (1992) exponen en su trabajo las ventajas que presentan las experiencias en columnas en comparación con las de tanque: se conserva el estado natural del suelo; la relación suelo/disolución en la columna es más parecida a la del campo; se utiliza más cantidad de suelo en las columnas lo que hace que los ensayos sean más representativos; se evita el efecto de la centrifugación; y el proceso de intercambio de iones en condiciones de flujo es más real.

Sin embargo, conviene recordar que, antes de realizar las experiencias de adsorción en columna, es de gran utilidad determinar los coeficientes de

---

<sup>23</sup> Miller D.M., Summer M.E., Miller P., *A comparison of batch and flow generated anion adsorption isotherms*. Soil Sci, Soc. Am. J. 53; 373-380; 1989

<sup>24</sup> Griffioen J., Appelo C.A.J., Van Veldhuizen M., *Practice of chromatography. Deriving isotherms from elution curves*. Soil Sci, Soc. Am. J. 56; 1429-1437; 1992



adsorción en tanque, porque ayudan a diseñar las experiencias en columna y a ajustar las condiciones operativas (caudal, concentración, etc.) y a obtener información para incluir en los modelos de transporte (Papini & Majone<sup>25</sup>, 1997).

Es posible efectuar una interpretación adecuada de los resultados experimentales en la columna mediante modelización. El destino de *LAS* en aguas subterráneas y suelos insaturados principalmente es gobernado por procesos de adsorción y de transporte, convección forzada y la dispersión. Por lo tanto el modelo debe incorporar ambos tipos de fenómenos aunque, como es evidente, los suelos, saturados o insaturados, son medios complejos y esto hace muy difícil una representación exacta. Si los procesos de adsorción-desorción son rápidos en relación a los procesos de transporte, el primero puede considerarse en un estado de equilibrio local, causando una simplificación física y matemática de los fenómenos. Sin embargo, en muchos casos, el equilibrio local no es admisible porque la suposición de adsorción rápida no se cumple y, por tanto, no pueden utilizarse modelos de equilibrio. En el caso particular de esta investigación, y, por esta razón, se seleccionó un modelo de no equilibrio, el denominado de dos zonas, para ajustar y discutir los datos experimentales. Las ecuaciones de transporte de este modelo unidimensional pueden ser expresarse en forma adimensional como:

$$\beta R \frac{\partial c_m}{\partial T} + (1 - \beta) R \frac{\partial c_{im}}{\partial T} = \frac{1}{Pe} \frac{\partial^2 c_m}{\partial X^2} - \frac{\partial c_m}{\partial X} \quad (5.18)$$

$$(1 - \beta) R \frac{\partial c_{im}}{\partial T} = \omega (C_m - C_{im}) \quad (5.19)$$

<sup>25</sup> Papini M.P., Majone M., *Experimental investigation of transport of strongly retained species by soil columns*. Water Air Soil Pollu. 95; 337-351, 1997

Donde los subíndices  $m$  e  $im$  se refieren a parámetros para las regiones móviles e inmóviles, respectivamente,  $C$  son las concentraciones adimensionales de las especies en disolución acuosa, la  $T$  es el tiempo adimensional de lixiviación a través de la columna de suelo, equivalente al número de volúmenes de poro,  $X$  es la distancia sin dimensiones,  $R$  es el factor de retraso medio total,  $Pe$  es el número de Peclet,  $\beta$  es la proporción entre el retraso móvil y el retraso total, y  $\omega$  es un parámetro de transferencia de masa sin dimensiones. Las relaciones matemáticas de estos parámetros con los parámetros físicos del sistema pueden ser expresadas como:

$$\mathbf{T} = \left( \frac{u t \theta_m}{L \theta} \right) \quad (5.20)$$

$$\mathbf{X} = \left( \frac{x}{L} \right) \quad (5.21)$$

$$\mathbf{Pe} = \left( \frac{u L}{D} \right) \quad (5.22)$$

$$\mathbf{R} = \left( 1 + \frac{\rho K_f}{\theta n} \bar{C}^{1/n-1} \right) \quad (5.23)$$

$$\beta = \left( \frac{R_m \theta_m}{R \theta} \right) \quad (5.24)$$

$$\omega = \left( \frac{\alpha L}{u \theta_m} \right) \quad (5.25)$$

Donde  $u$  es velocidad media en los poros o la velocidad de filtración  $\approx Q / (S \theta_m)$ ;  $t$  es el tiempo real;  $\theta_m$  el la porosidad del lecho móvil;  $L$  es la longitud de la columna;  $x$  es la distancia de entrada a la columna;  $D$  es el coeficiente de dispersión hidrodinámico;  $K_f$  y  $1/n$  son los coeficientes de Freundlich;  $\rho$  es la densidad total del suelo ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ );  $\alpha$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa y  $C$  es la relación  $C(t)/C_0$ .

La simulación numérica y el ajuste se hicieron usando un método Runge-Kutta para la integración combinado con el algoritmo Marquardt.

Para la realización de esta experiencia fue necesaria la preparación del lecho de suelo en la columna. Este proceso es de gran importancia ya que de él depende la existencia de flujos preferenciales en el interior del lecho, que pueden conducir a resultados no fiables que se traducen en coeficientes de adsorción menores que el valor real. Para ello, se ha utilizado el suelo previamente secado al aire y tamizado a 0.597 mm, que fue introducido en pequeñas porciones en la columna y fue compactada con la ayuda de un vibrador en varias etapas, para obtener una densidad uniforme a lo largo de todo el lecho e igual a la densidad aparente del suelo estudiado ( $1.36 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) medida en el campo. La cantidad de suelo introducida se calculó por diferencia de pesada. Una vez completada la carga de la columna, fue colocada en la parte superior una frita del N° 3 y un tapón de goma en cuyo centro se realiza una perforación para introducir un tubo de teflón de 1 mm de diámetro interior, por donde circularía el efluente. Las características de las columnas utilizadas se recogen en la **Tabla 5.17**.

**Tabla 5.17** - Características de la columna utilizada en los ensayos de adsorción y desorción

Características de la columna utilizada	Lecho saturado
Diámetro interno (mm)	23.8
Altura de la columna (mm)	103
Volumen de poros (mL)	9.88
Peso de suelo (g)	62.311
Velocidad del efluente (mL.Hora <sup>-1</sup> )	14
Volumen de las fracciones (mL)	10
Nº de fracciones colectadas	1200

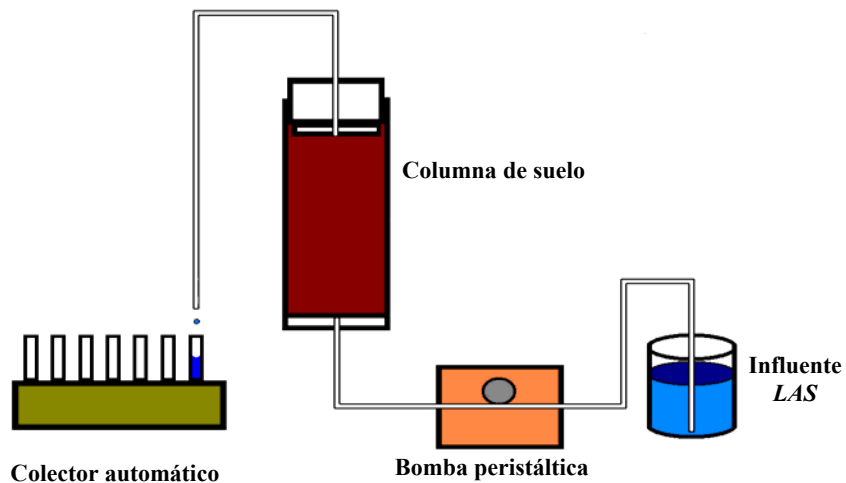
En la **Figura 5.14** se muestra el aspecto final de la columna antes de comenzar las experiencias.



**Figura 5.14** - Columna para ensayos de adsorción y desorción

La instalación experimental utilizada constaba de una bomba peristáltica *ISMATEC ISM 834 A*, ajustable a caudales de 1 a 20 mL·h<sup>-1</sup>. La salida de la bomba fue conectada en la parte inferior de la columna, por tanto, con un

flujo en el sentido ascendente. El influente fue una disolución acuosa del soluto estudiado (*LAS* en distintas concentraciones: 10.0; 20.0; 30.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La disolución de *LAS* estaba contenida en un recipiente donde estaba sumergido el tubo de succión de la entrada de la bomba. Las muestras del efluente se recogían a intervalos regulares de tiempo, con la ayuda de un colector automático que se programó previamente, y se almacenaban en unos frascos etiquetados convenientemente, para proceder a continuación la labor analítica. De estos frascos, se recogía parte de la fracción líquida (1.0 mL), que posteriormente era diluida con 1.0 mL de patrón interno para su posterior análisis por *HPLC/FLD*. Como referencia, también se sometía 1.0 mL de la disolución del influente junto con otro 1.0 mL de patrón interno, para calcular la concentración de los frascos. La instalación se ubicó en una habitación climatizada a 20 °C, para poder realizar comparaciones directas con los coeficientes determinados con las experiencias en discontinuo. En la **Figura 5.15** se representa un esquema de la instalación de los aparatos necesarios para efectuar esta experiencia.



**Figura 5.15** - Montaje utilizado para la realización de las experiencias en columna en lecho saturado

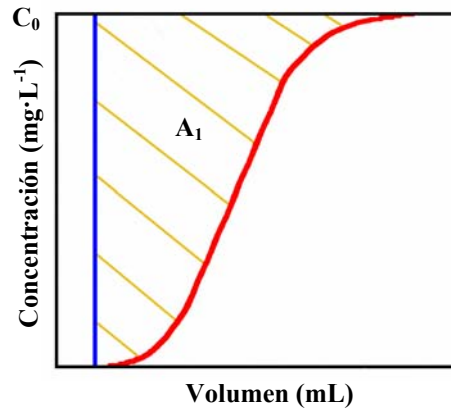


**Figura 5.16** - Vista del montaje utilizado para la realización de las experiencias en columna en lecho saturado

La representación gráfica de los resultados experimentales de la concentración del efluente frente a su volumen, constituye la curva de rotura de adsorción para cada homólogo estudiado.

A partir de las curvas de rotura se puede determinar la cantidad de soluto adsorbido, mediante la integración del área ( $A_1$ ) comprendida por la curva, a partir del volumen de poro, entre la línea correspondiente a la curva experimental del efluente y la línea correspondiente a la concentración del influente ( $C_0$ ). El valor calculado corresponde a la cantidad de soluto adsorbido por el suelo (**Figura 5.17**).

El cociente entre el área calculada (mg) y la masa de suelo que forma el lecho (g) es la cantidad relativa adsorbida ( $q$ ). Conocido este valor y la concentración del efluente ( $C_e$ ), es posible determinar la relación  $q = f(C_e)$  para las experiencias de adsorción en columna.



*Figura 5.17 - Curva de rotura*

#### A) Estudios con trazador

Para la caracterización del dispositivo experimental, se realizó un primer estudio de lixiviación utilizando disolución de bromuro de sodio, que no es adsorbido (parámetro de retención próximo a la unidad), como trazador y así poder establecer los mecanismos de transporte en la columna y obtener el módulo de dispersión ( $1/Pe$  o  $D/uL$ ).

Para ello se fijó un caudal constante, de disolución acuosa de bromuro sódico de concentración de  $88.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , analizando la curva de rotura (BTC) al final de la experiencia. Las fracciones fueron evaluadas a través del potencial eléctrico medido en un electrodo selectivo de bromuro. Para calcular la concentración de cada fracción, se realizó previamente un calibrado, empleando disoluciones de bromuro en agua Milli-Q de concentraciones 1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0; 20.0; 50.0 y  $100.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Las condiciones del experimento se muestran en la **Tabla 5.18**, mientras que los resultados de la curva de rotura están representados en la **Figura 5.18**.

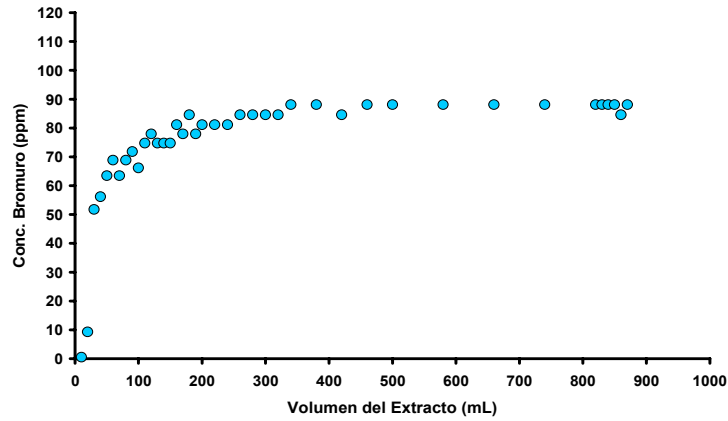


Figura 5.18 - Curva de rotura para el bromuro (trazador)

Tras la conversión a concentraciones relativas ( $C/C_0$ ) y representando frente al número de volumen de poro ( $NVP$ ), **Figura 5.19**, se puede apreciar que el modelo satisface el comportamiento experimental del trazador.

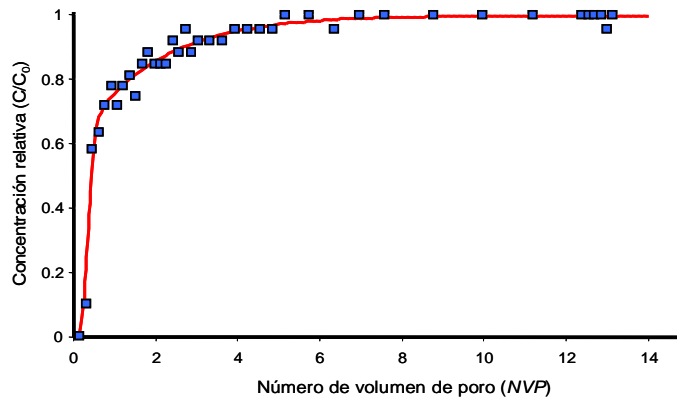


Figura 5.19 - Curva de respuesta adimensional para el trazador

En la siguiente tabla se muestran los valores de los parámetros característicos correspondientes a los dos mejores ajustes obtenidos. Las curvas correspondientes a ambos son indistinguibles. En ella se puede



observar que el parámetro de retención es prácticamente la unidad, poniendo de manifiesto la no adsorción del compuesto y que el volumen medido por pesada coincide con el volumen de poro. Todos los parámetros son muy parecidos en ambos ajustes, por lo que se emplea el valor medio a excepción del módulo de dispersión ( $D/uL$ ).

**Tabla 5.18** - Parámetros característicos para el ensayo con trazador

Parámetros	Ajuste 1	Ajuste 2
Suma de Cuadrados	$2.44 \cdot 10^{-2}$	$2.28 \cdot 10^{-2}$
Módulo de Sherwood (Sh)	0.43857269	0.4582074
Fracción instantánea de retención ( $\beta$ )	0.37742724	0.37091554
Coefficiente de retención (R)	1.00254128	0.99727876
Módulo de dispersión ( $D/uL$ )	0.0250	0.0167

## B) Estudios de adsorción y desorción de LAS

Cada experimento en columna comprendió dos etapas, inicialmente se estudió el proceso de adsorción y una vez concluido éste, se estudió la desorción del analito. Previamente se comprobó que el lecho de suelo carecía de LAS. Se pasó por la columna una disolución acuosa de LAS de concentración conocida al caudal seleccionado. Se representó la concentración del efluente hasta que se alcanzó un valor constante e igual a la concentración de la disolución de admisión. Esto puso de manifiesto la saturación del lecho de suelo y el final del proceso de adsorción.

A continuación se estudió el proceso de desorción, para lo cual la disolución de entrada se sustituyó por agua destilada. Se representó

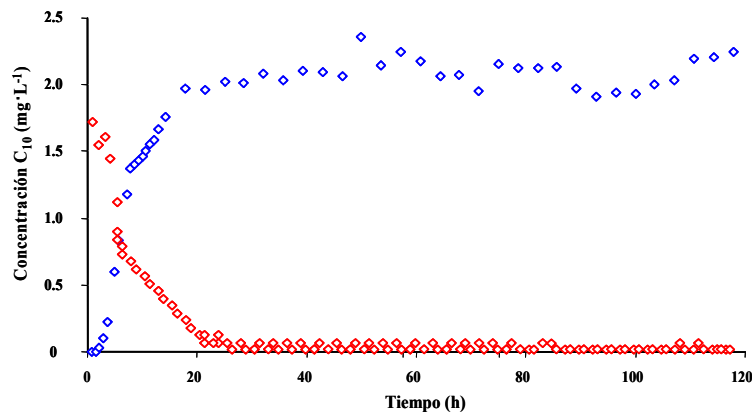
igualmente la concentración de efluente hasta que se alcanzaron los límites de detección del procedimiento analítico. Se obtuvo así una serie de curvas de rotura para la adsorción y desorción de cada homólogo del LAS. La porosidad del lecho fue calculada una vez conocido el peso de agua contenida en el volumen de lecho de suelo. Las propiedades del mismo y el caudal se muestran en la **Tabla 5.19**.

**Tabla 5.19** - Especificaciones en los experimentos de lecho de suelo empaquetado

Especificaciones	
Longitud del lecho (m)	0.103
Diámetro del lecho (m)	0.238
Porosidad (g)	0.57
Masa de lecho (g)	62.311
Densidad de partícula ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ )	1.36
Caudal ( $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	14.0
Concentración del trazador a la entrada ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	88.07
Concentración de LAS a la entrada ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	10.0; 20.0; 30.0

La integración numérica de una curva de respuesta experimental (curva de rotura) para el trazador, permite determinar la existencia y el valor de cualquier volumen dentro de la instalación experimental que, debido a la porosidad del lecho conserva una cantidad apreciable de sustancia química en el sistema. Este volumen es usado para corregir el LAS retenido en la columna para una mejor cuantificación de la adsorción del mismo.

En la **Figura 5.20** se representan, a modo de ejemplo, las curvas de rotura experimentales para la adsorción y desorción referentes al homólogo C<sub>10</sub>.



**Figura 5.20** - Curvas de rotura experimentales para la adsorción y desorción del homólogo  $C_{10}$  con una concentración de  $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total

Se analizaron también los datos experimentales correspondientes a los restantes homólogos ( $C_{11}$ ,  $C_{12}$  y  $C_{13}$ ) analizándolos para obtener la cantidad retenida de cada homólogo de LAS sobre el suelo y la cantidad lixiviada durante el proceso de flujo de agua. Fue considerado que, al final de cada experimento de adsorción, existe equilibrio entre la fase sólida y la acuosa y que la concentración en el efluente es cercana (idealmente igual) a la concentración de la disolución entrante. Fueron testadas tres concentraciones distintas:  $10.0$ ;  $20.0$ ;  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total.

Así, la masa de homólogo adsorbido por el suelo es determinada mediante un balance de masas durante el proceso de adsorción. Cada curva de adsorción fue usada para determinar la cantidad retenida y adsorbida según el siguiente procedimiento:

$$m_{\text{entrada}} - m_{\text{salida}} = m_{\text{retenida}} \quad (5.26)$$

Donde:

$$\mathbf{m}_{\text{entrada}} = \int_0^{\infty} [C_0 Q] dt \quad (5.27)$$

$$\mathbf{m}_{\text{salida}} = \int_0^{\infty} [C(t)Q] dt \quad (5.28)$$

Entonces:

$$\mathbf{m}_{\text{retenida}} = \int_0^{\infty} [C_0 - C(t)]Q dt \quad (5.29)$$

Se deduce que la masa adsorbida viene dada por:

$$\mathbf{m}_{\text{ads}} = \mathbf{m}_{\text{retenida}} - C_0 V \theta - C_0 V_C \quad (5.30)$$

Donde  $C_0$  es la concentración a la entrada,  $C(t)$  es la concentración de efluente a lo largo del tiempo,  $Q$  es el caudal volumétrico,  $V$  es el volumen del lecho de suelo,  $\theta$  es la porosidad y  $V_C$  es el volumen adicional en la instalación detectado con el trazador.

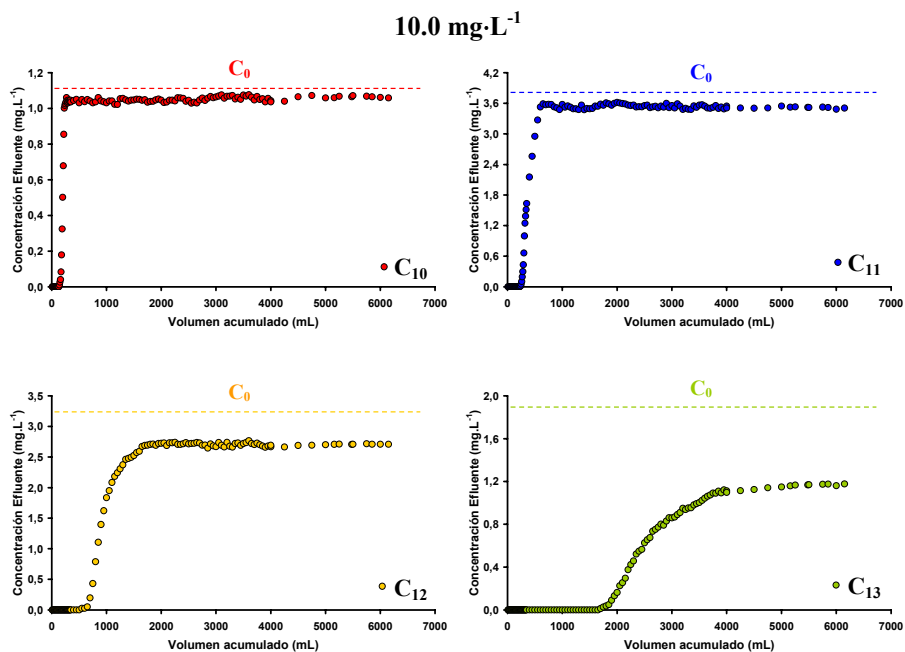
La división de  $m_{\text{ads}}$  por el peso del suelo en la columna (determinada gravimétricamente) da la respuesta en relación al suelo y permite obtener  $q$ , cantidad adsorbida de homólogo de LAS en  $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de suelo.

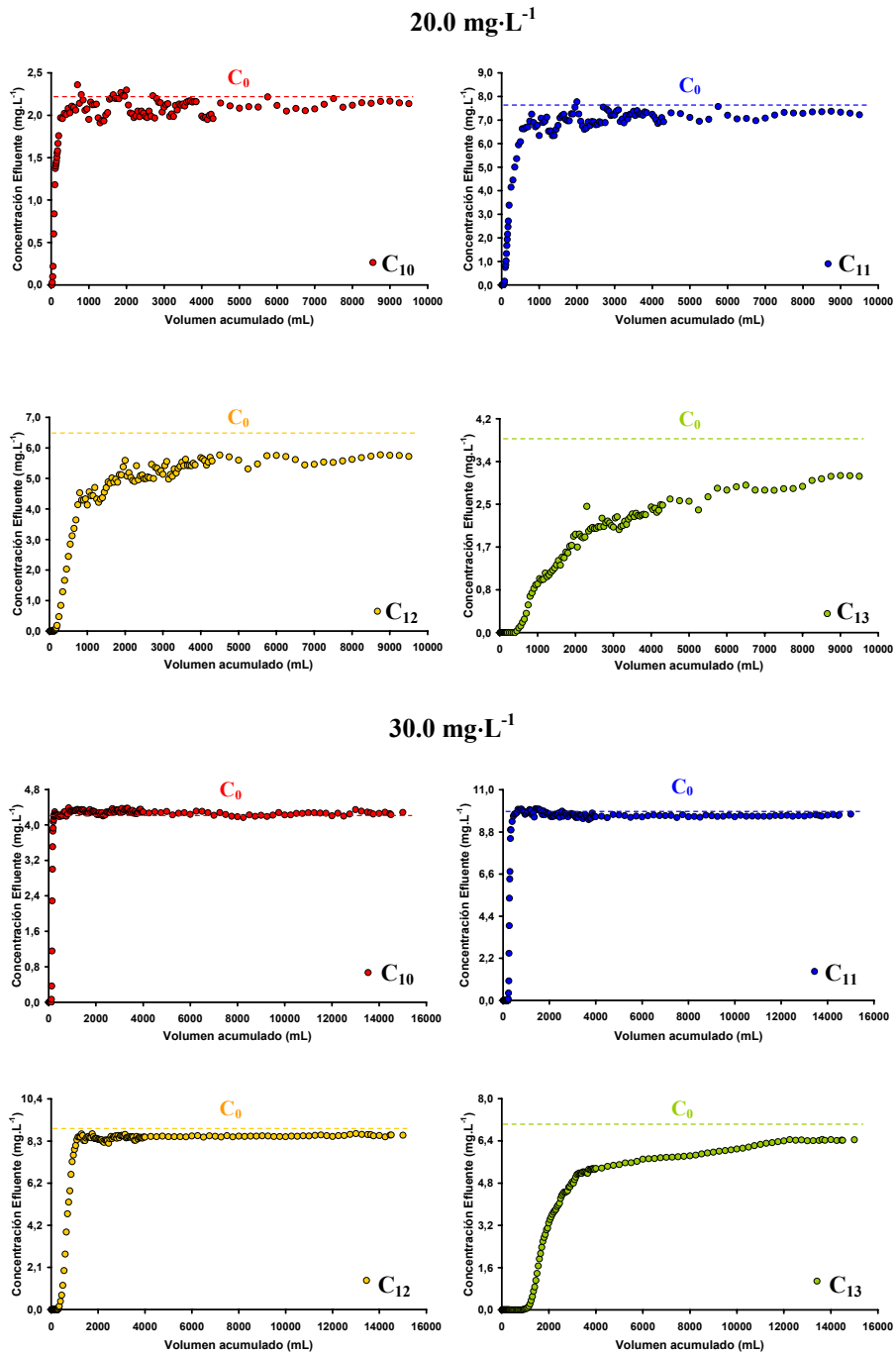
De un modo similar, la integración de perfiles de desorción permite el cálculo de la cantidad de cada homólogo del LAS desorbido, con el objetivo de comprobar la reversibilidad del proceso. Para realizar las experiencias de desorción en columna es necesario partir de un suelo que ha alcanzado previamente el equilibrio de adsorción. Para ello, una vez

alcanzada una concentración constante del efluente de la columna en las experiencias de adsorción en continuo, es decir, una vez finalizada cada una de las curvas de rotura correspondiente a cada uno de los distintos compuestos estudiados, se sustituye el influente que contiene el soluto por una disolución de agua destilada; de este modo se obtiene la curva de desorción que representa como la sustancia previamente retenida se va desorbiendo del suelo. Así, en estas experiencias de desorción se utiliza la misma instalación experimental y los mismos caudales que en las experiencias de adsorción realizadas previamente.

### B.1) Resultados de los ensayos de adsorción

Los resultados experimentales obtenidos, presentados como concentración de efluente ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) frente al volumen acumulado del mismo (mL) en las diferentes condiciones operativas, se recogen en la *Figura 5.21*.





**Figura 5.21-** Curvas de rotura de adsorción de los homólogos del LAS, con concentraciones de 10.0; 20.0; 30.0 mg·L<sup>-1</sup> a caudales de circulación de 14 mL·h<sup>-1</sup>

A partir del valor del área situada a la izquierda de cada una de las curvas de rotura (calculado por integración numérica), se ha determinado la cantidad de cada homólogo del LAS retenida y adsorbida en el lecho de suelo, para cada una de las concentraciones ensayadas.

Asimismo, se ha calculado el valor de la eficacia de adsorción del lecho, comparando la cantidad adsorbida ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de suelo), obtenida a partir de las curvas de rotura, con la máxima capacidad de adsorción del suelo ( $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de suelo), calculada para cada concentración de LAS en el influente, a partir de la isoterma obtenida en tanque discontinuo, donde la mezcla se supone perfecta. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.20**.

**Tabla 5.20-** Valores de las masas adsorbidas, tanto en tanque como en columna (lecho saturado) y eficacia de la adsorción en las diferentes condiciones ensayadas

Concentración inicial del influente	LAS Homólogos	Masa adsorbida ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de suelo)		Eficacia de adsorción columna/tanque (%)
		Tanque	Columna	
10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	C <sub>10</sub>	5.39	7.48	138.77
	C <sub>11</sub>	48.60	41.84	86.08
	C <sub>12</sub>	89.89	70.25	78.15
	C <sub>13</sub>	136.36	88.21	64.69
20.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	C <sub>10</sub>	8.82	10.73	121.60
	C <sub>11</sub>	82.18	63.69	77.50
	C <sub>12</sub>	153.04	116.41	76.07
	C <sub>13</sub>	226.65	150.41	66.36
30.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	C <sub>10</sub>	13.84	22.94	165.73
	C <sub>11</sub>	98.61	106.71	108.22
	C <sub>12</sub>	199.4	159.78	80.13
	C <sub>13</sub>	371.5	393.08	105.81

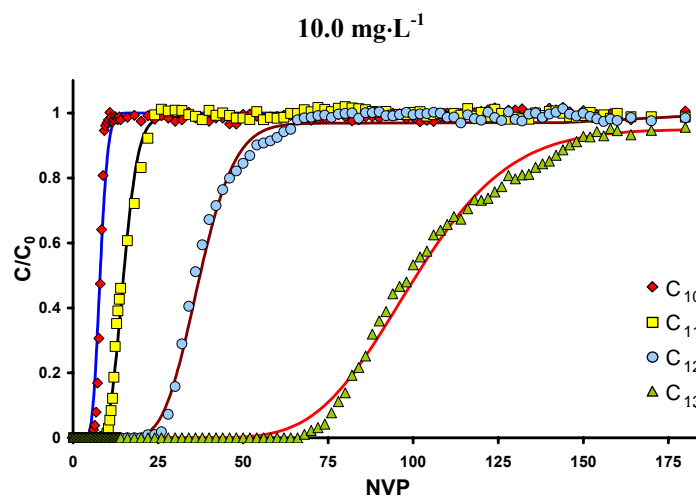
Las eficacias de adsorción observadas (**Tabla 5.20**) resultan muy semejantes para todos los homólogos de *LAS* para las concentraciones de 10.0 y 20.0 mg·L<sup>-1</sup>. Por otra parte, los valores de la masa absorbida del homólogo C<sub>10</sub> en columna superan en las tres concentraciones de 10.0; 20.0 y 30 mg·L<sup>-1</sup>, a las correspondientes masas adsorbidas en tanque agitado discontinuo (*batch*), lo que sugiere la posibilidad de la existencia de precipitación de este compuesto (*LAS-C*<sub>10</sub>) sobre el suelo estudiado. Ello puede atribuirse al elevado contenido en el mismo de iones calcio y magnesio solubles y parece resultar avalado por el hecho de que, cuando la concentración total de *LAS* en la disolución alimentada es más elevada (30.0 mg·L<sup>-1</sup>), todos los homólogos, salvo el C<sub>12</sub>, presentan eficacias de adsorción superiores al 100%.

El valor medio de la eficacia de adsorción para los homólogos C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>, en las concentraciones de *LAS* de 10.0 y 20.0 mg·L<sup>-1</sup>, resulta bastante elevado (el valor medio es aproximadamente de 75%). No obstante, el hecho de que ninguno de ellos se aproxime al 100% permite afirmar que, en general, existen zonas del lecho de suelo donde aparecen importantes limitaciones al transporte del *LAS*, lo que provoca que haya un escaso o nulo acceso de éste a una fracción significativa de la superficie donde se produce la adsorción y por tanto que exista control cinético de la misma. Sin embargo, en las experiencias en *batch*, toda la superficie de las partículas del suelo, al estar en agitación continua, están en contacto con la solución que contiene el soluto. Las cantidades adsorbidas calculadas mediante las experiencias en discontinuo, aunque son ligeramente más elevadas que las obtenidas de los ensayos en flujo continuo, constituyen una buena orientación en el caso de las



condiciones de adsorción lineal, o casi-lineal. Ese hecho, desde el punto de vista metodológico, resulta ventajoso puesto que las experiencias en *batch* son menos laboriosas que las de columna, como ya señalaron Johnson & Farmer<sup>26</sup> (1993), Allen<sup>27</sup> *et al.* (1995) y Li & Shuman<sup>28</sup> (1997).

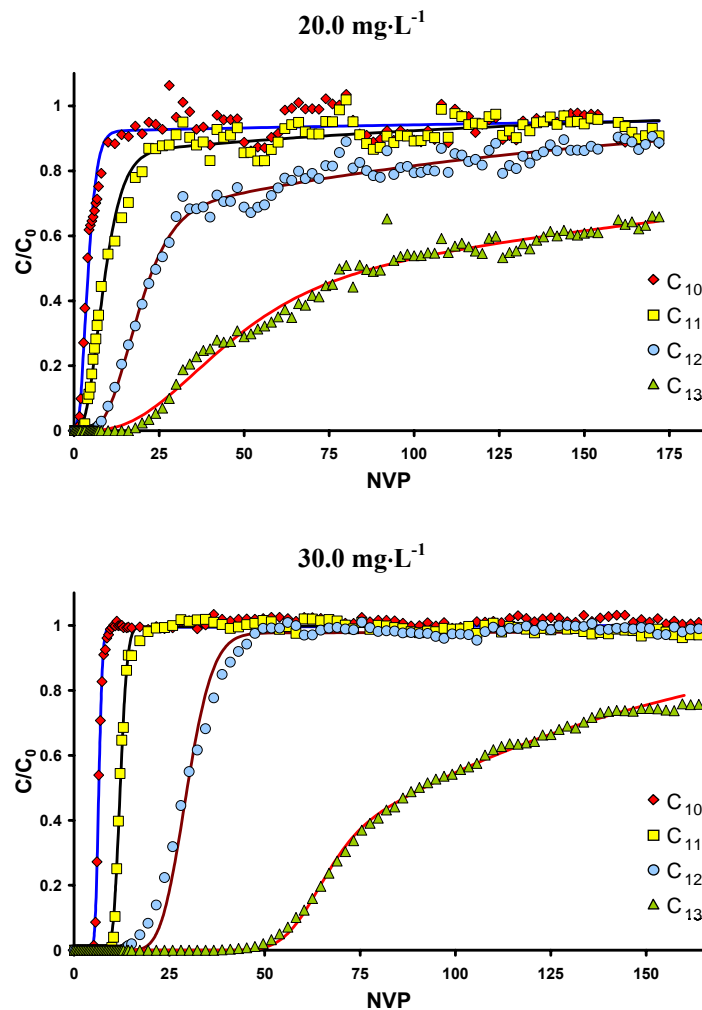
Por otro lado, con objeto de proceder a su análisis, en la **Figura 5.22** se recogen, para una concentración total de *LAS* en la corriente alimento de 10.0; 20.0 y 30.0 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente, las curvas de rotura experimentales (símbolos discontinuos) correspondientes a los cuatro homólogos, representadas como concentración relativa en el efluente ( $C/C_0$ ) frente a número de volúmenes de poros (*NVP*).



<sup>26</sup> Johnson J.A., Farmer W.J., *Batch versus column method for determining distribution of organics between soil and water phases*. Soil Science 155; 92-99, 1993

<sup>27</sup> Allen H.E., Chen Y.T., Li Y., Huang C.P., *Soil partition coefficients for Cd by column desorption and comparison to batch adsorption measurements*. Environ. Sci. Technol. 29; 1887-1891, 1995

<sup>28</sup> Li Z., Shuman L.M., *Estimation of retardation factor of dissolved organic carbon in sandy soils using batch experiments*. Geoderma 78; 197-206, 1997



**Figura 5.22** - Curvas de rotura experimentales (puntos) y simulada (líneas continuas) para cada homólogo con concentraciones de LAS total de 10.0; 20.0 y 30.0 mg·L<sup>-1</sup>

En las mismas se aprecia que, para todas las concentraciones ensayadas, existe un comportamiento semejante de la adsorción de los compuestos sobre el suelo en cuanto a su relación con la longitud de la cadena alquílica de cada homólogo, observándose que en todos los casos se produce un incremento de la retención con el número de carbonos que componen la molécula del tensioactivo, variando el *NVP* de rotura

$C \approx 0,05 \cdot C_0$  desde aproximadamente 5 para el  $C_{10}$  hasta más de 60 para el  $C_{13}$ . De todo ello se puede concluir que, en el intervalo de concentraciones y caudales ensayados, la adsorción de LAS en el suelo estudiado está afectada apreciablemente por el tamaño de la cadena, lo que coincide con los resultados obtenidos en los ensayos en discontinuo.

Por todo lo anterior, los resultados experimentales correspondientes a las curvas de rotura obtenidas a partir de las experiencias en columna se han ajustado al modelo bizonal propuesto en el apartado **8.2.3.2: Transporte de solutos**, del **Capítulo de Introducción: Aspectos teóricos influyentes en la movilidad de un compuesto**.

En la **Figura 5.22** también se ha representado como una línea continua el resultado del ajuste de los resultados experimentales al modelo bizonal. Como puede apreciarse, el modelo bizonal reproduce satisfactoriamente los resultados experimentales. Los valores de los diferentes parámetros de dicho ajuste se recogen en la **Tabla 5.21**.

**Tabla 5.21** - Valores de los parámetros de ajuste del modelo bizonal para la adsorción de LAS en lecho saturado de suelo

Coeficiente de retención (R)				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	14.04	33.75	75.75	176.14
20.0	14.02	29.55	64.17	188.24
30.0	10.00	26.06	55.63	119.23
Fracción instantánea de retención (β)				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.57	0.45	0.50	0.58
20.0	0.32	0.32	0.32	0.32
30.0	0.65	0.47	0.54	0.54

Tabla 5.21 - Continuación

Módulo de Sherwood (Sh)				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	1.5·10 <sup>-2</sup>	1.5·10 <sup>-2</sup>	3.0·10 <sup>-2</sup>	5.0·10 <sup>-2</sup>
20.0	9.0·10 <sup>-2</sup>	16.0·10 <sup>-2</sup>	41.0·10 <sup>-2</sup>	81·10 <sup>-2</sup>
30.0	0.6·10 <sup>-2</sup>	0.5·10 <sup>-2</sup>	2.0·10 <sup>-2</sup>	0.9·10 <sup>-2</sup>
Módulo de dispersión (D/uL)				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.025	0.025	0.025	0.025
20.0	0.125	0.125	0.125	0.125
30.0	0.010	0.010	0.010	0.010
Número de puntos experimentales				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	125	125	125	125
20.0	100	100	100	100
30.0	154	154	154	154
Suma de Cuadrados (C <sub>exp</sub> /C <sub>0</sub> -C <sub>pred</sub> /C <sub>0</sub> ) <sup>2</sup>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.218	0.055	0.047	0.079
20.0	0.258	0.121	0.070	0.078
30.0	0.012	0.025	0.082	0.008

Los valores del coeficiente de retención resultan ser notablemente semejantes a los obtenidos mediante linealización a partir de las isothermas de las experiencias en *batch*, (Tabla 5.22) para cada concentración de homólogo alimentada, y más aún si se tienen en cuenta las diferencias entre las condiciones en las que se realizan los dos tipos de experiencias (condiciones de equilibrio, valores de la razón suelo/disolución, etc.).

$$\bar{R} = \left( 1 + \frac{\rho K_r C_0 \left( \frac{1}{n} - 1 \right)}{\theta} \right) \quad (5.31)$$

**Tabla 5.22** - Coeficiente de retención (*R*) calculados a partir de las isotermas en batch

Coeficiente de retención ( <i>R</i> ) de las isotermas en batch				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	13.98	33.99	75.90	179.32
20.0	11.46	28.60	64.42	156.24
30.0	9.61	27.42	59.90	139.41

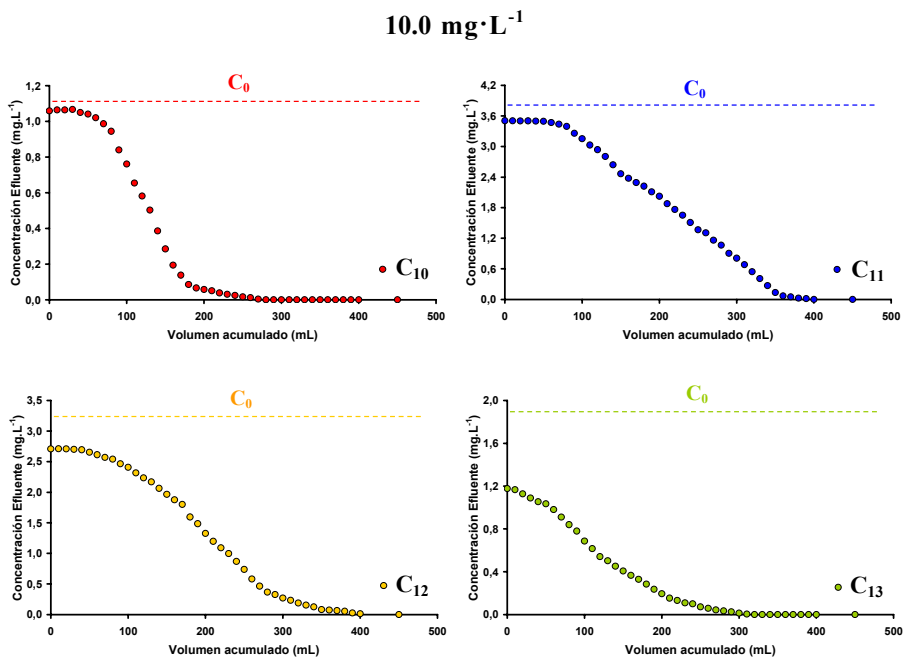
El conjunto de los valores de la fracción instantánea de retención ( $\beta \approx 0.50$ ) indican que aproximadamente la mitad de la retención de los homólogos del *LAS* se produce de manera instantánea, mientras que la otra mitad se produce con una velocidad dependiente del módulo de Sherwood, que tiene unos valores muy reducidos, del orden de las centésimas. Dicho módulo, por tanto, al presentar valores comprendidos entre  $0.5 \cdot 10^{-2}$  y  $81 \cdot 10^{-2}$ , refleja que, en general, la fracción de retención no instantánea se produce de un modo notablemente lento sea cual sea el valor de la concentración de *LAS* alimentada al sistema.

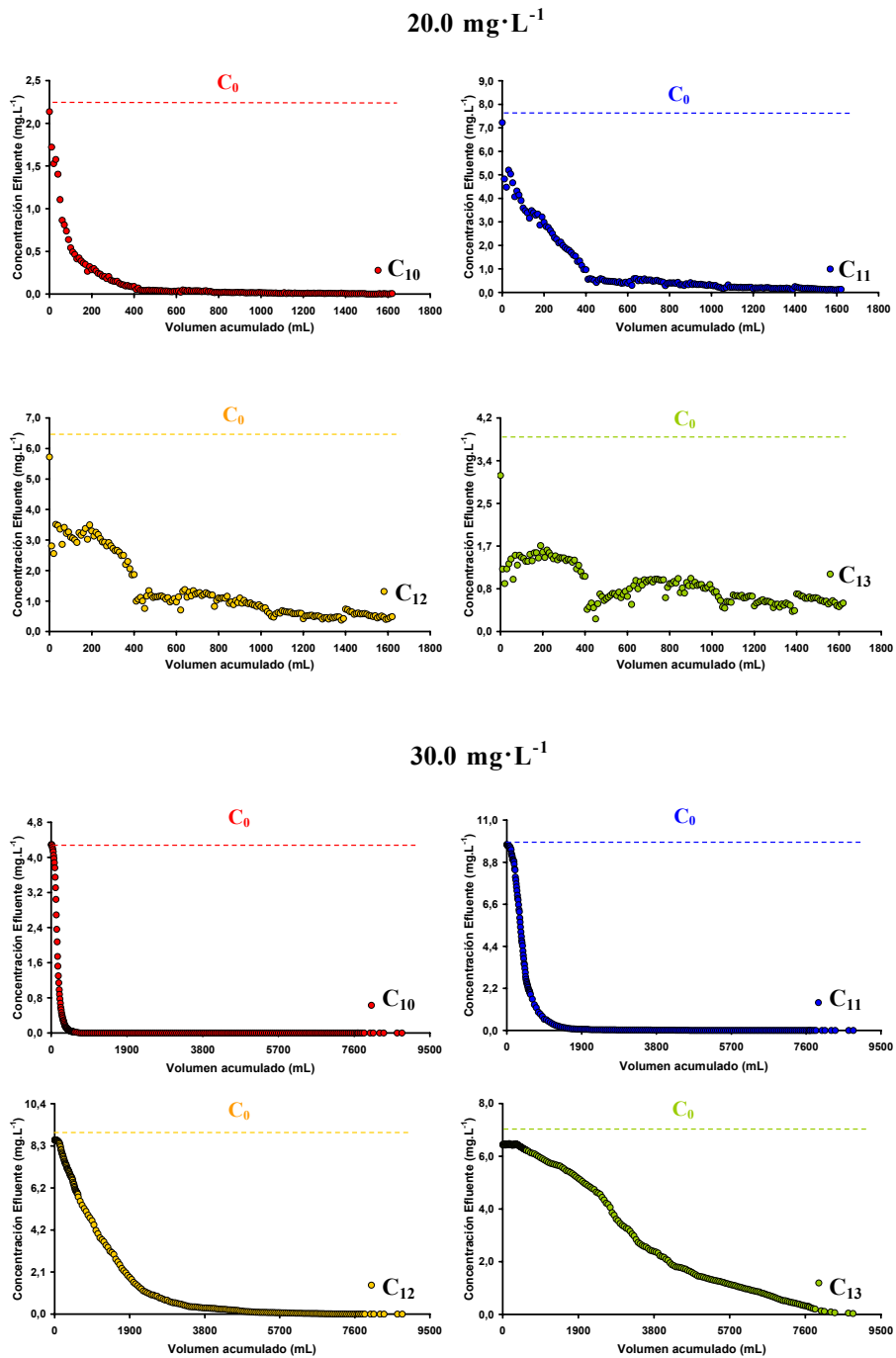
Los valores obtenidos del módulo de dispersión ( $I/Pe$ ) están comprendidos entre 0.01 y 0.125. La variación de este módulo se atribuye fundamentalmente al hecho de que los lechos son preparados a partir de suelo extraído, lo que supone que, a pesar de presentar características macroscópicas (masa, dimensiones, etc.) muy semejantes, no resultan idénticas.

En resumen, el modelo bizonal ajusta satisfactoriamente los resultados experimentales de adsorción de los homólogos de *LAS*, los valores del coeficiente de la retención ( $R$ ) son del mismo orden de magnitud que los calculados utilizando las constantes de adsorción obtenidas a partir de los resultados de adsorción en *batch*, y el modelo también coincide con los resultados de las experiencias cinéticas, en lo que se refiere a la instantaneidad del proceso de adsorción del *LAS* en el suelo estudiado.

## B.2) Resultados de los ensayos de desorción

Una vez finalizada la adsorción, con concentraciones iniciales de 10.0; 20.0 y 30.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* total en la disolución alimentada, se han obtenido las curvas correspondientes a las experiencias de desorción, alimentando para ello el lecho de suelo con un caudal de  $14.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  de agua destilada. Los resultados se han representado en la **Figura 5.23**.





**Figura 5.23-** Curvas de rotura de desorción de los homólogos del LAS, con concentraciones de 10.0; 20.0; 30.0 mg·L<sup>-1</sup> a caudales de circulación de 14 mL·h<sup>-1</sup>

Integrando el área situada bajo las curvas (*Figura 5.23*) se calculan las masas del soluto desorbidas. Asimismo se ha determinado la relación entre la desorción y la adsorción de cada homólogo en el lecho estudiado. Los resultados correspondientes se muestran en la *Tabla 5.23*.

*Tabla 5.23- Valores de las masas desorbidas y adsorbidas en columna (lecho saturado) y relación entre desorción/adsorción en las diferentes condiciones ensayadas*

Concentración inicial	LAS Homólogos	Masa en columna (mg·kg <sup>-1</sup> de suelo)		Relación entre desorción/adsorción (%)
		Desorbida	Adsorbida	
10.0 mg·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub>	2.21	7.48	29.55
	C <sub>11</sub>	12.71	41.84	30.38
	C <sub>12</sub>	8.56	70.25	12.19
	C <sub>13</sub>	2.45	88.21	2.78
20.0 mg·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub>	3.08	10.73	28.75
	C <sub>11</sub>	24.41	63.69	38.32
	C <sub>12</sub>	36.88	116.41	31.68
	C <sub>13</sub>	27.59	150.41	18.34
30.0 mg·L <sup>-1</sup>	C <sub>10</sub>	11.57	22.94	50.46
	C <sub>11</sub>	72.06	106.71	67.53
	C <sub>12</sub>	180.46	159.78	112.94
	C <sub>13</sub>	377.96	393.08	96.15

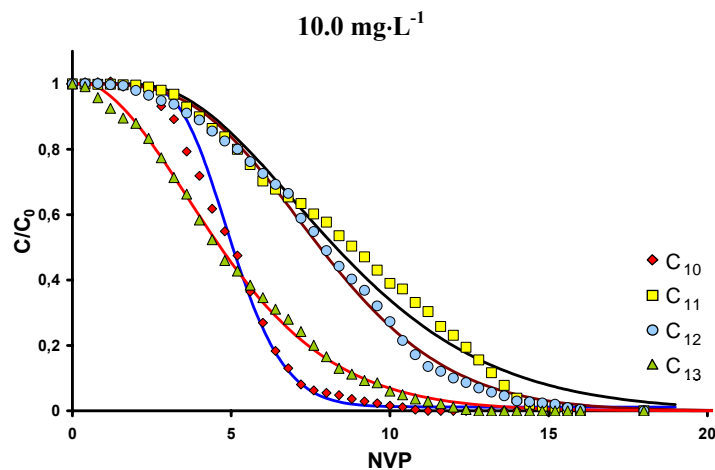
Comparando las masas de los cuatro homólogos desorbidas de la columna (*Tabla 5.23*) con las adsorbidas previamente, se observa que para las dos concentraciones inferiores (10.0 y 20.0 mg·L<sup>-1</sup>) las fracciones que se

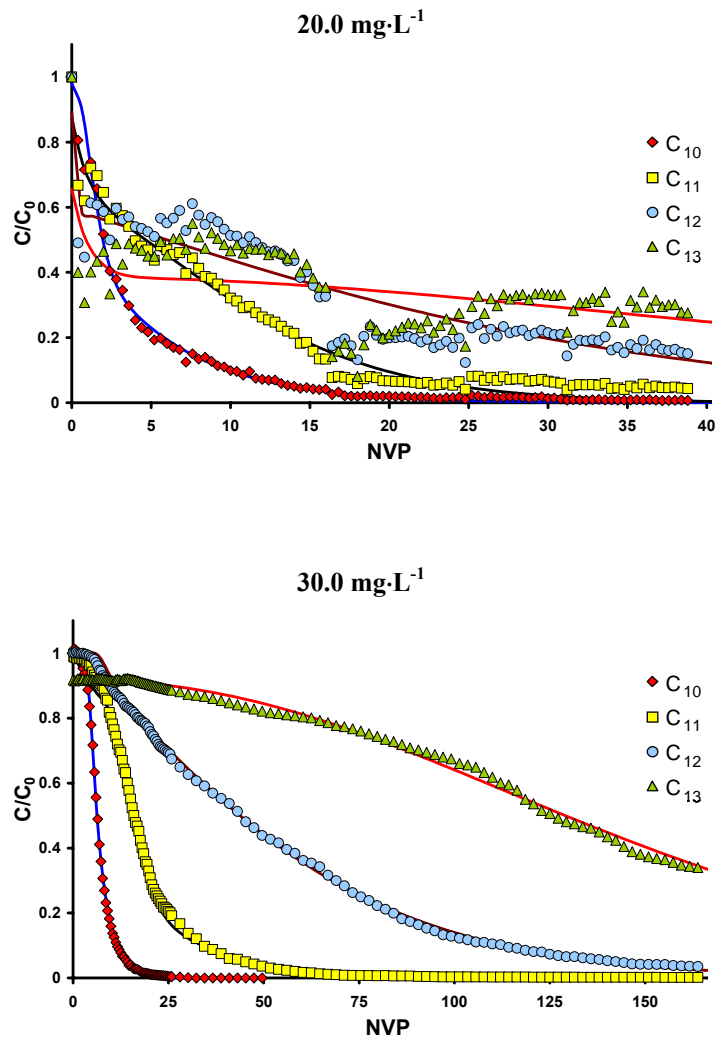


recuperan no superan en ningún caso el 40% de la masa adsorbida, llegando a alcanzarse un valor de masa desorbida inferior al 3% de la masa adsorbida para el caso del homólogo  $C_{13}$ , cuando su concentración en la corriente de entrada a la columna es de  $1.90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* total).

Esta aparente histéresis podría deberse a la anteriormente aludida precipitación o más probablemente a procesos de degradación avalada por el hecho de que el valor de la relación de desorción/adsorción crece con la concentración de *LAS* alimentada, siendo mucho más elevada, incluso completa para alguno de los homólogos, cuando la concentración inicial es  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Con objeto de proceder a su análisis, en la **Figura 5.24** se recogen las curvas de desorción experimentales (símbolos discontinuos) correspondientes a los cuatro homólogos, representadas como concentración relativa en el efluente ( $C/C_0$ ) frente a número de volúmenes de poros (*NVP*).





**Figura 5.24** - Ajuste al modelo bizonal de las curvas de desorción experimentales para cada homólogo con concentraciones de LAS total de 10.0; 20.0 y 30.0 mg·L<sup>-1</sup> durante la adsorción

El modelo bizonal, como se puede observar en la **Figura 5.24**, reproduce satisfactoriamente las curvas de desorción y permite obtener los valores de los parámetros de ajuste que se presentan en la **Tabla 5.24**.

**Tabla 5.24** - Valores de los parámetros de ajuste del modelo bizonal para la desorción de LAS en lecho saturado de suelo

<b>Coefficiente de retención (R)</b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	9.00	8.90	8.10	5.20
20.0	4.40	13.00	21.70	50.10
30.0	7.20	23.30	54.60	149.00
<b>Fracción instantánea de retención (β)</b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.57	0.41	0.10	0.20
20.0	0.41	0.55	0.01	0.10
30.0	0.74	0.72	0.20	0.05
<b>Módulo de Sherwood (Sh)</b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	1.2·10 <sup>-2</sup>	4.69	15.00	5.17
20.0	66.0·10 <sup>-2</sup>	2.81	2.48	4.90
30.0	85·10 <sup>-2</sup>	0.44	2.24	7.43
<b>Módulo de dispersión (D/uL)</b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.030	0.025	0.025	0.025
20.0	0.125	0.125	0.083	0.125
30.0	0.030	0.030	0.025	0.025
<b>Número de puntos experimentales</b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	45	45	45	45
20.0	158	164	164	164
30.0	74	215	215	215
<b>Suma de Cuadrados (C<sub>exp</sub>/C<sub>0</sub>-C<sub>pred</sub>/C<sub>0</sub>)<sup>2</sup></b>				
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0	0.034	0.071	0.017	0.009
20.0	0.055	0.173	0.558	0.956
30.0	0.010	0.058	0.028	0.024

El ajuste del modelo bizonal a las experiencias de desorción del *LAS* proporciona valores del coeficiente de retardo notablemente diferentes a los obtenidos en las experiencias de adsorción de *LAS*, tanto en columna como en *batch*, con excepción de los ensayos realizados a la concentración más elevada ( $30.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), lo que indica que en este último caso el proceso de adsorción-desorción es un fenómeno reversible y que casi la totalidad del *LAS* adsorbido estará biodisponible si las concentraciones son elevadas, posibilitando su biodegradación.

Por otra parte, la hipótesis acerca de la posible existencia de histéresis-degradación parece confirmarse para concentraciones inferiores porque el valor del coeficiente de retardo obtenido de la desorción del suelo de una concentración inicial de  $10.0$  y  $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de *LAS* es muy inferior al valor medio del mismo coeficiente obtenido en la adsorción.

Por su parte, los valores de la fracción instantánea de desorción ( $\beta$ ) se extienden desde  $0.01$  a  $0.72$ , resultando notablemente dispersos si se comparan con los obtenidos durante la adsorción.

También se puede verificar, mediante el análisis de los resultados, que en las columnas alimentadas por *LAS* a distintas concentraciones ( $10.0$ ;  $20.0$  y  $30.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), una vez alcanzado el equilibrio de los distintos homólogos en sus respectivos lechos, en la mayoría de los casos la concentración del efluente es inferior a la del influente (**Tabla 5.25**). Esto puede ser atribuido a que, en mayor o menor grado tiene lugar su biodegradación y/o precipitación en forma de sales cálcicas y magnésicas. En el caso de la biodegradación, al tratarse de experiencias prolongadas en el tiempo, son sensibles a posibles contaminaciones microbiológicas pues además se producen las condiciones idóneas para ello, aporte de: carbono (*LAS*), micronutrientes, oxígeno disuelto en agua y temperatura ambiente ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

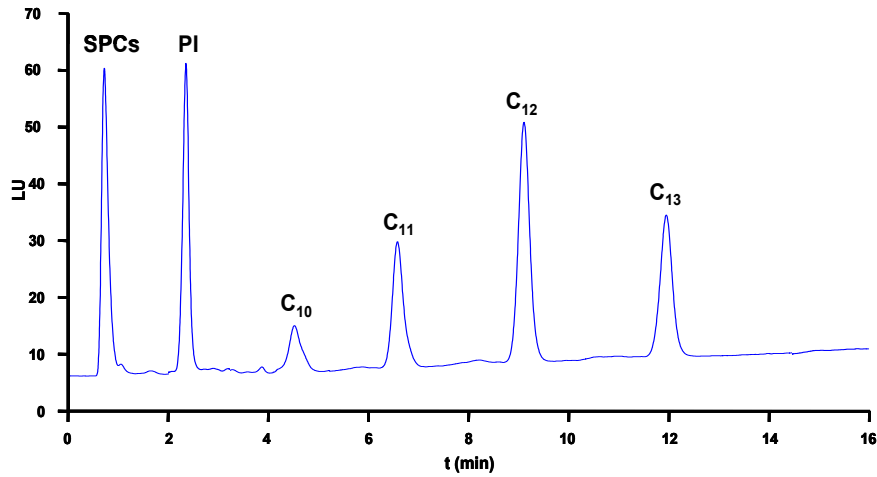
Tabla 5.25 - Relación entre concentración de efluente e influente

	Concentración efluente / Concentración influente			
	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
10.0 mg·L <sup>-1</sup>	94.59	92.66	86.16	61.97
20.0 mg·L <sup>-1</sup>	94.29	92.96	89.31	76.68
30.0 mg·L <sup>-1</sup>	100.79	98.78	95.49	91.55

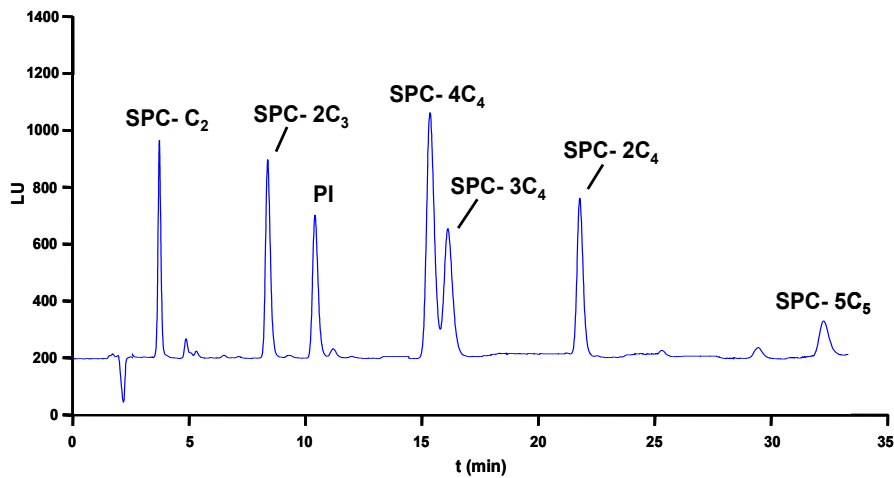
Así en la **Figura 5.21**, correspondiente a la experiencia realizada en columna alimentada por LAS a 10.0 mg·L<sup>-1</sup>, puede observarse que ninguno de los homólogos a la salida de la columna, llega a igualar la concentración del influente. También se puede apreciar que cuanto mayor es la cadena alquímica del homólogo más evidente se hace este comportamiento.

En la columna alimentada por LAS a 20.0 mg·L<sup>-1</sup>, (**Figura 5.21**) se observa un comportamiento similar. Sin embargo, durante el proceso de desorción (**Figura 5.23**) se observa este fenómeno de forma nítidamente más acentuada, es decir, se verifica que hay una mayor e inusual disminución de la concentración del efluente en relación a la de equilibrio. Al analizar uno de los cromatogramas de este efluente, (**Figura 5.25**), puede observarse a 0.8 minutos un pico intenso, característico de los SPCs (productos de degradación aeróbica del LAS). En la **Figura 5.26** se muestra el cromatograma de la misma disolución de efluente, pero llevado a cabo con el método adecuado para el análisis de SPCs (Jiménez-Días<sup>29</sup> *et al.*, en publicación). En él claramente se observa la existencia de los SPCs más característicos.

<sup>29</sup> Jiménez-Días I., Ballesteros O., Navalón A., Vilchez J.L., *New Liquid chromatographic method for determination of sulfophenylcarboxylic acids. Evolution study of linear alkylbenzene sulfonates biodegradation in a agricultural soil.* Talanta (in publication)



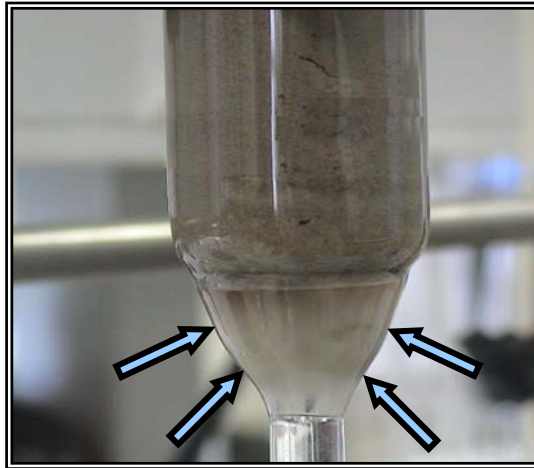
**Figura 5.25** - Cromatograma del efluente de la columna alimentada con  $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total



**Figura 5.26** - Análisis de los SPCs en el efluente de la columna alimentada con  $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de LAS total

Esta columna con el tiempo generó una biopelícula donde ha sido aislado un conjunto de bacterias capaces de degradar el LAS, como puede apreciarse en la **Figura 5.27**, en la que se está realizando, actualmente, la

identificación genética de estos microorganismos por técnicas de replicación de ácido desoxirribonucleico (ADN).



*Figura 5.27 - Biopelícula en la columna alimentada con 20.0 mg·L<sup>-1</sup> de LAS total*

#### 4 - EXPERIENCIA EN CAMPO

Este estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el comportamiento del analito en un determinado ambiente natural, donde puede ser aportado por diferentes mecanismos, siendo empleado para esta finalidad, la irrigación forzada. Esta evaluación constaría del análisis de muestras provenientes del campo, tanto del suelo (matriz sólida) como del agua lixiviada (muestra líquida).

Para la realización de las todas las experiencias llevadas a cabo en el campo fueron necesarias algunas etapas previas concernientes a la puesta a punto de la metodología, que incluye tanto la preparación de la zona de experimentación como la adecuada selección de los materiales empleados.

#### 4.1 - Descripción de las parcelas experimentales

La parcela experimental está situada en la Vega de Granada. Con una extensión de 2.500 m<sup>2</sup>, ha sido subdividida en subparcelas de 36 m<sup>2</sup>, dos de las cuales se han utilizado para los ensayos de la presente investigación. Un aspecto de las subparcelas se muestra en la **Figura 5.28**.

En la subparcela experimental se han colocado tres series de tres hidrocaptores, totalizando nueve hidrocaptores, situados a una distancia entre si de aproximadamente 1 metro y a una profundidad de 25, 50 y 75 cm respectivamente. En la siguiente imagen puede observarse su distribución.

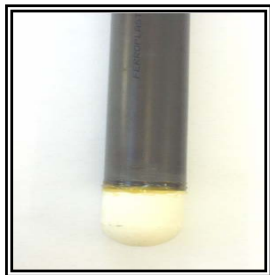


**Figura 5.28** - Vista general de las parcelas experimentales

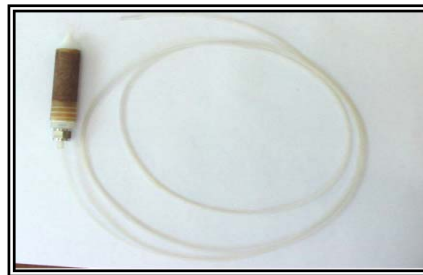


#### 4.2 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de agua

Para la obtención de muestras de agua intersticial, en la bibliografía consultada, se utilizan diferentes tipos de tomamuestras de succión (hidrocaptos) equipados fundamentalmente con cápsulas de cerámica científica o de teflón, **Figuras 5.29** y **5.30**. La mayoría de los trabajos consultados estudian el comportamiento de dichas cápsulas y se detectan tanto problemas de cambio iónico, adsorción, desorción, etc. Razón por la cual antes de su empleo experimental en campo se ha estudiado previamente su comportamiento frente a los distintos homólogos del LAS, en este tipo de cápsulas (de cerámica científica y de teflón) y en un diseño alternativo realizado por nosotros con diferentes materiales como PVC, cobre y acero inoxidable.



**Figura 5.29** - Hidroceptor cerámico



**Figura 5.30** - Hidroceptor de teflón

##### 4.2.1 - Características de los hidrocaptos estudiados

Las cápsulas de cerámica fueron fabricadas por *SDEC* (Francia) y contienen proporciones variables de kaolinita, aluminio, aglomerados de arcilla y otros componentes. Las cápsulas de teflón fueron adquiridas en *PRENART EQUIPMENT APS* (Dinamarca). Los tubos de PVC, cobre y

acero inoxidable fueron suministrados por almacenes comerciales especializados. Las principales características de los hidrocaptos estudiados se recogen en la **Tabla 5.26**.

**Tabla 5.26** - Características físicas de dos de las cápsulas estudiadas

	Teflón	Cerámica
<b>Tamaño de poro</b>	3.0 $\mu\text{m}$	2.0 $\mu\text{m}$
<b>Dimensiones</b>	DI 21mm x L 95 mm	DI 51.5 mm x L 88.2 mm
<b>Conductividad hidráulica</b>	$3.31 \cdot 10^{-7} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$9.50 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$
<b>Peso</b>	50 g	160 g

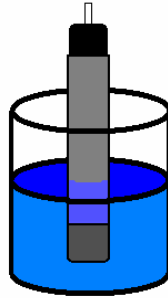
#### 4.2.2 - Ensayos preliminares con los hidrocaptos

La revisión de los antecedentes bibliográficos para esta investigación ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar ensayos preliminares de laboratorio para conocer la idoneidad de estas cápsulas.

Las cápsulas de cerámica se lavaron al principio con ácido clorhídrico diluido, seguido de un lavado con agua destilada, a fin de reducir la liberación de compuestos de material cerámico.

Para la realización del estudio se siguió el siguiente procedimiento operativo: se sumergieron las cápsulas en un vaso de precipitado de 500 mL que contiene la disolución patrón (disolución de  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de LAS total o del homólogo en cuestión) como se puede apreciar en la **Figura 5.31** y se somete a un vacío con una presión de 60 cbar; se utiliza este valor de presión para así conseguir una solución de compromiso entre el tiempo necesario de

toma de muestra, y evitar el riesgo de captar muestra (agua intersticial) en zonas alejadas al hidrocaptor y por lo tanto no representativas de la profundidad a la que se considera que este se haya colocado.



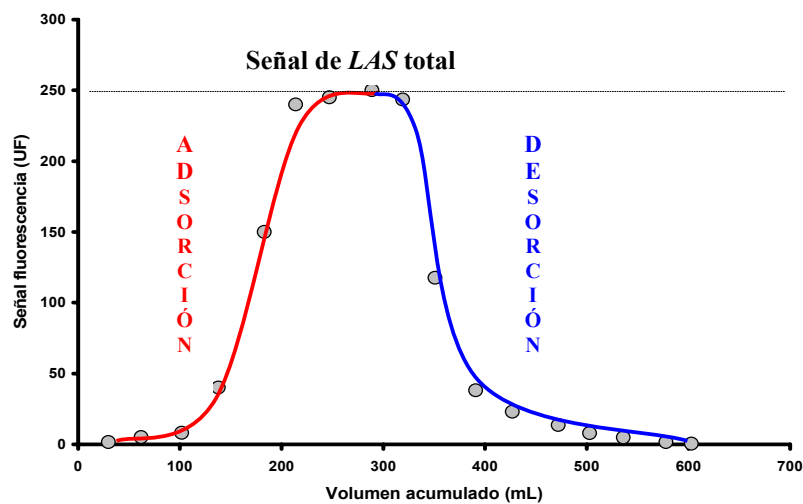
**Figura 5.31** - Esquema del montaje experimental de los ensayos en laboratorio realizados con los hidrocaptos estudiados

A continuación se midió el volumen de disolución colectado al aplicar el vacío evacuando el líquido del reservorio del hidrocaptor sobre una probeta de 100 mL. Se tomaron medidas de fluorescencia de la disolución que ha conseguido entrar en el interior del hidrocaptor a unas longitudes de onda de emisión y excitación de 292 nm y 226 nm, respectivamente. A continuación se tomó una nueva medida aplicando el mismo procedimiento operatorio antes descrito.

Los datos así obtenidos se representan colocando en el eje de abscisas el volumen total de disolución colectada o acumulada (en mililitros), siendo ésta la suma de las alícuotas individuales recogidas en cada succión, en función de la intensidad relativa de fluorescencia referida al valor dado por la disolución madre sin pasar por la cápsula.

En el caso de las cápsulas de teflón el procedimiento operatorio fue el mismo pero omitiendo el lavado con ácido clorhídrico.

Para los ensayos con los tubos de *PVC*, cobre y acero inoxidable, éstos fueron sumergidos también en disoluciones patrón y se tomaron medidas de fluorescencia de la disolución patrón al inicio y luego, distintas medidas, a cada cierto intervalo de tiempo. Para la adsorción, una vez que se alcanzase de manera aproximada un valor constante en la intensidad de fluorescencia de las alícuotas recogidas, se consideraba que la cápsula había llegado a saturarse siendo en este punto cuando se daba por finalizada la experiencia. Para la desorción, se cambió la disolución de *LAS* por una con sólo agua Milli-Q y se hizo el mismo procedimiento. En las **Figuras 5.32** y **5.33** se muestran las gráficas para los distintos hidrocaptadores comerciales empleados (cerámica y teflón). En la primera de ellas se representa el comportamiento del hidrocaptor de teflón frente a una disolución de *LAS*. En la segunda se muestra el comportamiento del hidrocaptor cerámico frente a cada uno de los diferentes homólogos del *LAS* y también relacionado con el *LAS* total.



**Figura 5.32** - Adsorción y desorción del *LAS* total en el hidrocaptor de teflón

Para la adsorción, una vez que se alcanzase de manera aproximada un valor

constante en la intensidad de fluorescencia de las alícuotas recogidas, se consideraba que la cápsula había llegado a saturarse siendo en este punto cuando se daba por finalizada la experiencia.

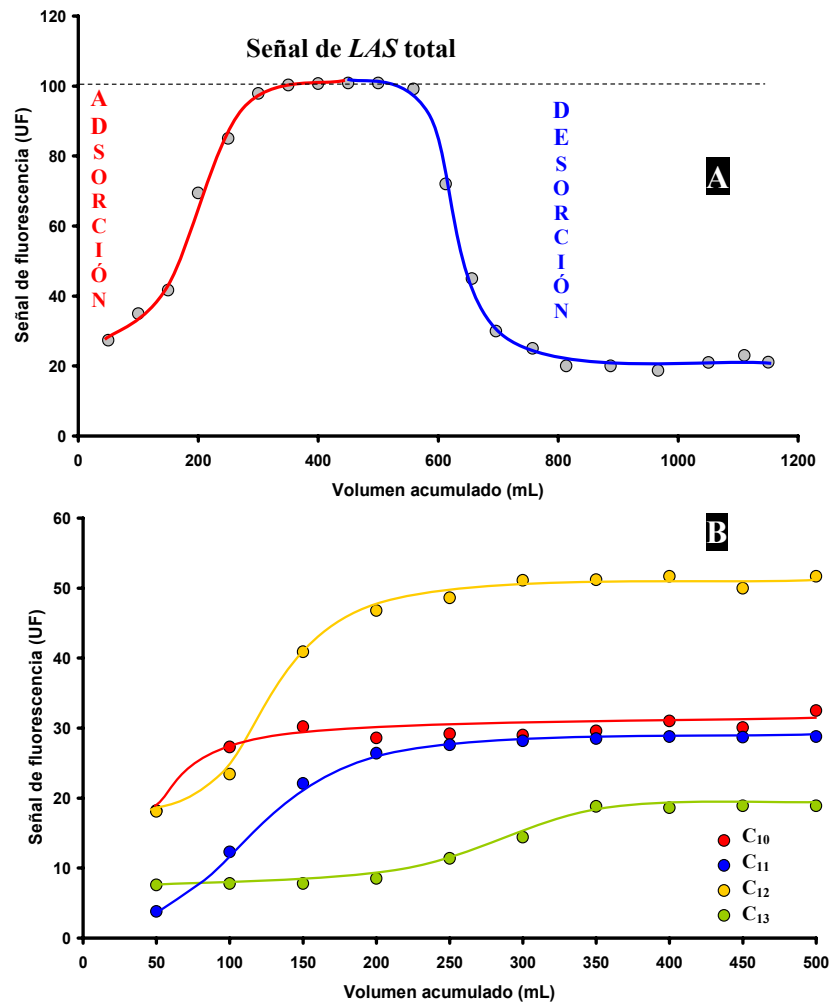


Figura 5.33 - **A**: Adsorción y desorción del LAS total **B**: Adsorción de los homólogos del LAS en el hidrocaptor de cerámica

La observación de las anteriores figuras permite obtener las siguientes conclusiones:

- 1 - El *LAS* presenta una considerable fijación en ambos hidrocaptorees comerciales.
- 2 - Al aumentar el número de carbonos en la cadena alquílica del correspondiente homólogo aumenta el fenómeno de fijación. Así el  $C_{13}$  es el homólogo que menor concentración de *LAS* presenta en la disolución acuosa recuperada, siendo por tanto el que mayor fijación muestra en la membrana.
- 3 - No es recomendable por tanto el empleo de estos tipos de hidrocaptorees para la realización de los estudios de campo.

Ante los resultados obtenidos con el empleo de los hidrocaptorees de cerámica y de teflón en los que se concluye que no son útiles para los estudios de campo, se decidió realizar un diseño alternativo de hidrocaptorees empleando nuevos materiales como *PVC*, cobre y acero inoxidable. Con estos nuevos materiales se realizaron los mismos ensayos para comprobar si presentaban fenómenos de fijación. En la **Figura 5.34** se muestran los resultados obtenidos. Los resultados son expresados en abscisas (tiempo transcurrido desde el contacto del material con una disolución patrón de *LAS* total a  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) por la ordenada (valor relativo de la señal fluorescente proveniente de la cantidad de *LAS* total encontrada en la disolución que estuvo en contacto con los materiales sobre la cantidad total de *LAS* añadida). Como puede apreciarse de su observación, el *LAS* presenta fijación sobre el cobre, en cambio en *PVC* y en acero inoxidable no se presentan tales fenómenos. Por ello estos dos materiales, *PVC* y acero inoxidable, son los empleados en el diseño de hidrocaptorees adecuados que pudiesen satisfacer las necesidades en la toma de muestra para nuestras experiencias de campo.

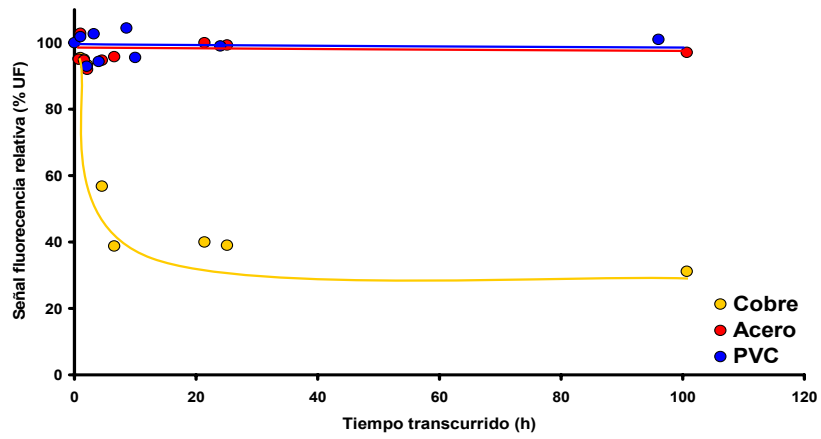


Figura 5.34 - Adsorción del LAS por los diferentes materiales probados

Para la construcción de los nuevos hidrocaptadores se ha empleado tubería de PVC de 50 mm de diámetro según el diseño que se muestra en la **Figura 5.35**. Como puede apreciarse consta de un tubo de longitud variable dependiendo de la profundidad donde se realice la toma de muestra, un filtro de acero inoxidable y un reservorio donde se recoge la muestra de agua a analizar.

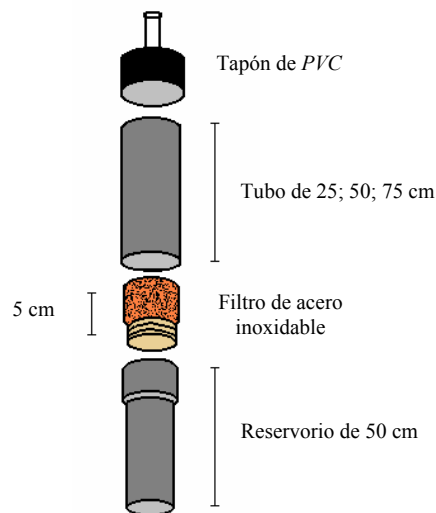
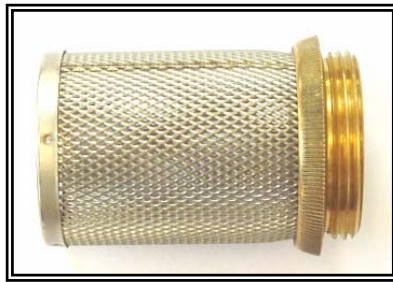


Figura 5.35 - Composición del hidrocaptor

El montaje de este tipo de hidrocaptor fue realizado uniendo las piezas de *PVC* de 50 mm de diámetro con pegamento adecuado. Las uniones donde se encontraban piezas de material diferente (acero inoxidable - *PVC*) se fijaron usando una resina epoxi, después de acoplar el tubo de *PVC* por calentamiento con el filtro de acero inoxidable (**Figura 5.36**).



**Figura 5.36** - Filtro de acero inoxidable

Una vez ensamblado el hidrocaptor, el filtro fue rodeado con una malla metálica con las siguientes características:

- luz de malla: 0.125 mm
- diámetro: 0.06 mm
- superficie útil aproximada de paso: 45.5%
- número de mallas por pulgada lineal: 150

Esta malla tenía el objetivo de evitar, en la medida de lo posible, la entrada de partículas en suspensión. El volumen del reservorio fue de 400 mL. En la **Figura 5.37** se muestra el hidrocaptor una vez ensamblado.





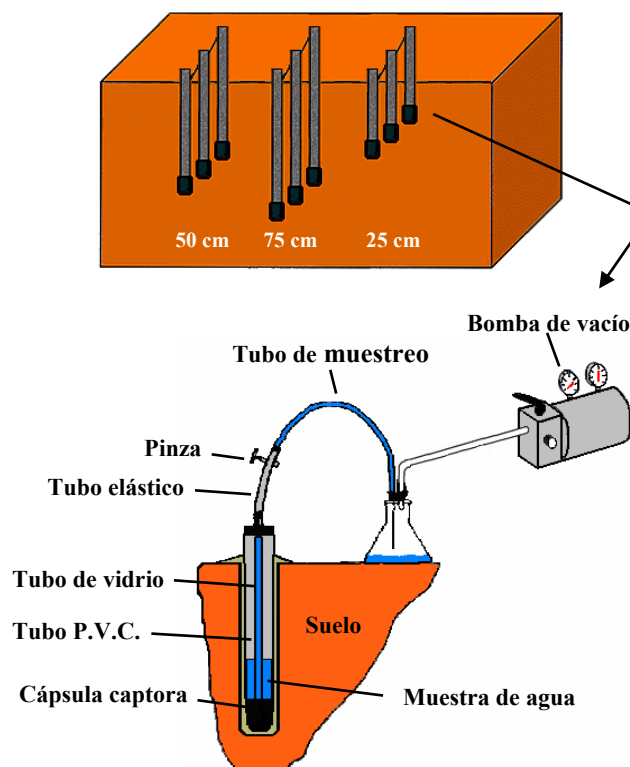
**Figura 5.37 - Hidrocaptor de PVC**

Este fue, finalmente, el tipo de hidrocaptor empleado. Estos consistían en un tubo de *PVC* de 50 mm de diámetro, con longitudes de 25.0; 50.0 y 75.0 cm, que llevaba sellado en su extremo inferior una cápsula de acero inoxidable y, en el extremo superior, un tapón perforado en su centro donde se le había introducido un tubo metálico de unos 5 mm de diámetro, a través del cual se efectuaba la aplicación del vacío mediante una bomba eléctrica y la toma de muestra. La instalación de los hidrocaptos en suelo se realizó perforando de forma manual con una barrena helicoidal de tipo *EIJKELKAMP*, con un diámetro igual o ligeramente superior al del tomamuestras hasta las profundidades 25.0; 50.0 y 75.0 cm.

El hidrocaptor se introdujo en la perforación realizada y se rodeó de una pasta compuesta de suelo, de los alrededores de la zona de estudio, tamizada a 2 mm, y agua. La textura debe ser la adecuada para asegurar una buena uniformidad en el hueco interanular que se genera entre el hidrocaptor y el suelo, evitando así caminos preferenciales que falseen las medidas tomadas. Además, puede ocurrir que a la hora de irrigar la zona en estudio, el agua tienda a acceder hacia el hidrocaptor por esta zona si se considera que preferentemente el flujo es vertical; la veracidad de las medidas así tomadas podrían ser discutibles. Para evitar estos flujos preferenciales se colocó alrededor del cilindro superior de *PVC*, a nivel de tierra, un disco de material plástico que cubre unos 4 o 5 cm de terreno

alrededor del hidrocaptor; con lo cual se fuerza que el drenaje del agua se realice a través de suelo representativo. Con objeto de evitar la alteración de la superficie de la parcela por los trabajos a realizar y al mismo tiempo facilitar la toma de muestra se han situado dos plataformas metálicas en los pasillos limitados por las tres filas de hidrocaptadores. La toma de muestra se hizo con una bomba de vacío eléctrica *SCHOTT IBERICA MZ 2C* aplicando de forma continua un vacío de 60 cbar.

En la **Figura 5.38**, se puede apreciar un esquema representativo relacionado con la colecta de muestras líquidas por medio de los hidrocaptadores situados a distintas profundidades (25.0, 50.0, 75.0 cm).



**Figura 5.38** - Esquema de los hidrocaptadores fijados en el suelo a distintas profundidades y de la colecta de muestras líquidas

Para medir la temperatura, tanto del suelo como la ambiental, se utilizaron cuatro termómetros digitales. Tres sondas fueron situadas a distintas profundidades: 10.0; 25.0 y 50.0 cm. El cuarto termómetro registró la temperatura ambiental.

El índice de evaporación del agua, fue un dato suministrado por la Estación Meteorológica de Granada (101 - Estación Meteorológica de CIFA).

La temperatura y humedad del aire, así como la velocidad y dirección del viento fueron datos suministrados por la Estación Meteorológica del Aeropuerto de Granada (84190 - LEGR), situado en el municipio de Santa Fé, en las cercanías de la Finca de Santa María.

Para la toma de muestras provenientes de los hidrocaptores, se han instalado unos tubos de polietileno conectados a la bomba de vacío entre los que se intercalaban sus correspondientes kitsatos de polietileno de 500 mL de capacidad volumétrica. De esta forma la succión de la muestra acuosa ubicada en los hidrocaptores se efectuaba con gran rapidez. El uso del vacío fue necesario para la colecta de muestras a profundidades de 50.0 y 75.0 cm. Las muestras de hidrocaptores situados a 25.0 cm de profundidad la colecta no necesitaba el auxilio del vacío. De modo ilustrativo, en la siguiente imagen se muestra con detalle la operación de colecta en los hidrocaptores.

De hecho, para comprobar el funcionamiento de los hidrocaptores, se regó la parcela en diferentes ocasiones con un caudal de  $130 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$ , y después de cada riego, se recogieron alrededor de 350 mL de agua por riego en cada uno de los hidrocaptores (capacidad aproximada del hidrocaptor 400 mL), concluyendo que los hidrocaptores estaban adecuadamente instalados y aptos para la realización de experimentos.



*Figura 5.39 - Detalle de la toma de muestra*

#### 4.2.3 - Ensayo con trazador

Con objeto de caracterizar el comportamiento hidrodinámico de cada uno de los hidrocaptos colocados en la parcela experimental, y teniendo en cuenta investigaciones anteriores que utilizaron la humedad, u otros trazadores físicos o químicos, para el estudio de la hidrodinámica de la zona no saturada (ZNS) (Topp & Davis<sup>30</sup>, 1982; Allison<sup>31</sup>, 1987; Martínez<sup>32</sup>, 1990; Araguás & López<sup>33</sup>, 1995; López &

<sup>30</sup> Topp G.C, Davis J.L., *Measurement of soil water content using time domain reflectometry*. Canadian Hydrology. Symposium, Ottawa, Canadian, p. 269-287, 1982

<sup>31</sup> Allison G.B., *A review of some of the physical, chemical and isotopic techniques available for estimating groundwater recharge*. Workshop Estimating National Recharge of Groundwater. Turkey, p. 43-66, 1987

<sup>32</sup> Martínez Fernández J., *Estudio de las características hidrodinámicas de los suelos: el método del recipiente de tensión hídrica*. 1ª Reunión Nacional de Geomorfología. Teruel, España, p. 699-708, 1990

<sup>33</sup> Araguás L., López Vera F., *Estudio de transferencia de humedad en la ZNS mediante isótopos estables. Primeros resultados en el acuífero detrítico de Madrid. Avances en la investigación en ZNS*. Ed. Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria, España, p. 181-191, 1995

Giráldez<sup>34</sup>, 1995; Giráldez & Laguna<sup>35</sup>, 1995), se realizó una experiencia empleando ión bromuro como trazador químico.

Antes de realizar la aplicación del bromuro en el campo, se hizo un calibrado para correlacionar el potencial medido en el electrodo con una determinada concentración. De este modo se disolvió determinadas cantidades de bromuro en agua de pozo (usada para el riego), de forma que se obtuviera las siguientes concentraciones (1.0; 3.0; 5.0; 7.0; 10.0; 20.0; 50.0; 100.0 mg·L<sup>-1</sup>), permitiendo que el electrodo se quedara listo para realizar las mediciones de las fracciones.

El ensayo se realizó en ausencia de precipitaciones, con altas temperaturas y baja humedad ambiente. La dosis de ión bromuro aplicada fue de 13.06 g·m<sup>-2</sup>. Su aplicación fue realizada por aspersión con la ayuda de una mochila en la que se introdujo la disolución de KBr. Una vez distribuida homogéneamente la disolución de trazador sobre la parcela, se procedió a la realización de riegos sucesivos y continuos con una dotación de 83.77 L·min<sup>-1</sup> (139.61 L·m<sup>-2</sup> en cada riego), siendo cada riego de 1 hora y realizando hasta 7 riegos. El agua intersticial fue recogida después de la aplicación de cada riego mediante el empleo de los tomamuestras descritos anteriormente, situados a 25.0, 50.0 y 75.0 cm de profundidad, empleando los hidrocaptos seleccionados en el apartado anterior. Una vez colectadas las muestras se procedió a la medida de su potencial “in situ” y su conversión a concentración mediante la correspondiente función de calibrado obtenida con

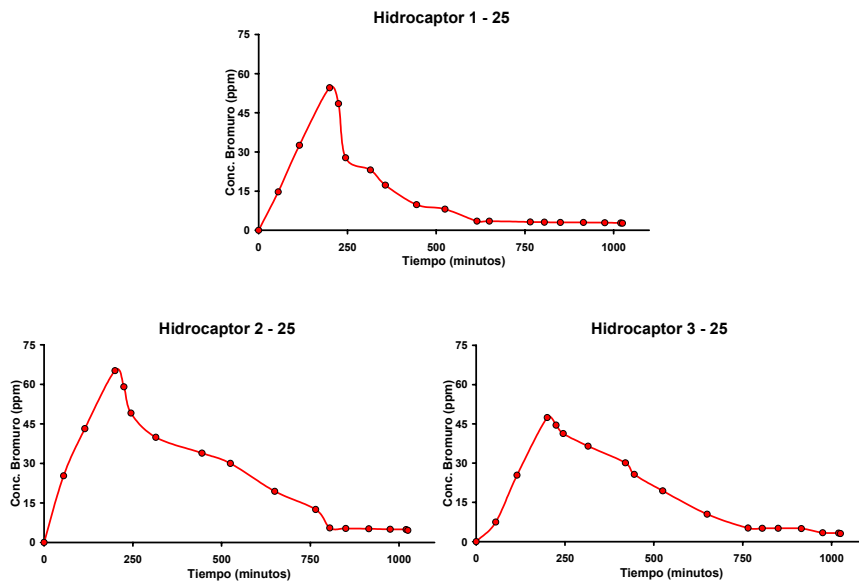
---

<sup>34</sup> López J.J., Giráldez J.V., *Estudio de la evolución del contenido de humedad del suelo en áreas cultivadas. Aplicación a dos zonas climáticas diferentes de Navarra. Avances en la investigación en ZNS*. Ed. Servicio de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria, España, p. 165-180, 1995

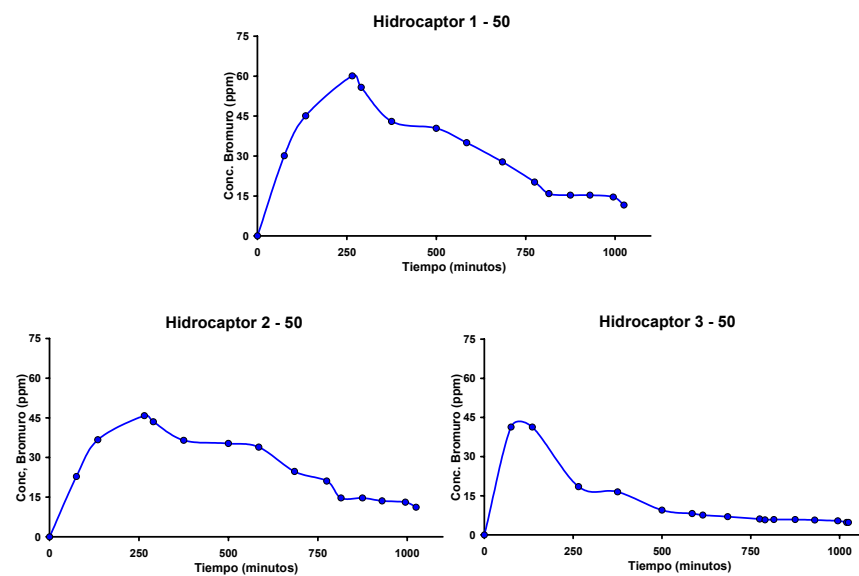
<sup>35</sup> Giráldez J.V., Laguna A., *Un modelo analítico para el estudio del flujo de agua en suelos subsaturados. Avances en la investigación en ZNS*. Vitoria, España, p. 237-244, 1995

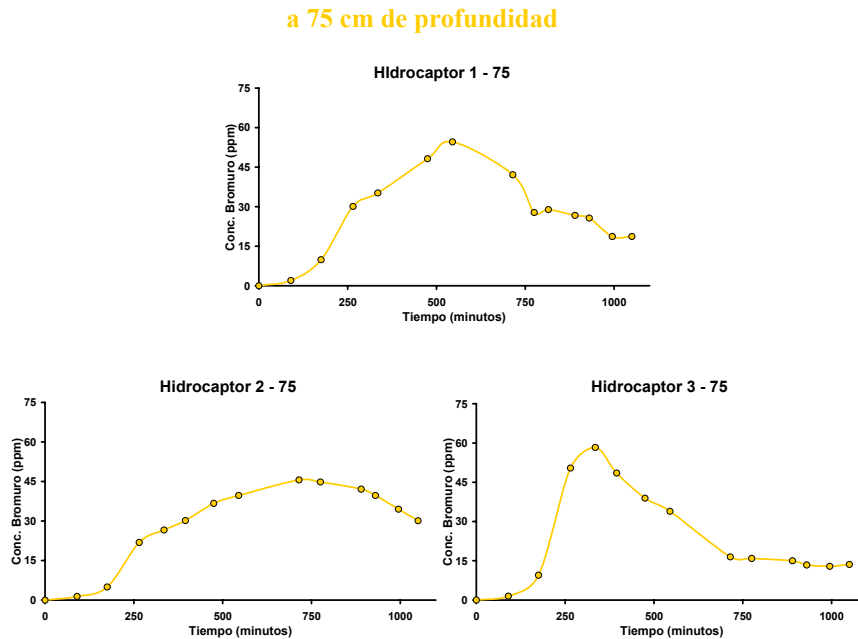
anterioridad. En la **Figura 5.40** se representa la concentración de bromuro frente al tiempo transcurrido de irrigación.

**a 25 cm de profundidad**



**a 50 cm de profundidad**





**Figura 5.40** - Comportamiento del bromuro en los distintos hidrocaptos

Los resultados anteriores, permiten concluir que:

- 1 - Los tres hidrocaptos situados a 25 cm muestran un comportamiento muy homogéneo. Alcanzan la máxima concentración de bromuro a los 180 minutos de riego y el frente ha pasado a los 400 minutos.
- 2 - Los hidrocaptos 1-50 y 2-50 alcanzan la máxima concentración de bromuro a los 250 minutos de riego. En el hidrocaptor 3-50 se observa un comportamiento distinto, incluso muy parecido a los de 25 cm, que se atribuye a la existencia de flujos preferenciales, por lo que se extrajo y se procedió nuevamente a su introducción.
- 3 - En los hidrocaptos situados a 75 cm, el frente de bromuros inicia su

paso a partir de los 250 minutos. El 1-75 y 2-75 muestran un comportamiento más parecido, ya que entre ellos el frente de bromuros se prolonga durante largo tiempo. En el 3-75 se observa una rápida caída a partir de 325 minutos.

#### 4.2.4 - Ensayo con *LAS*

Una vez establecido el comportamiento hidrodinámico de los hidrocaptadores, se procedió a la realización de un ensayo previo al estudio estacional, consistente en una aportación puntual de *LAS* a la parcela y estudiar su evolución tras la realización de riegos periódicos. Como en el caso del trazador, el ensayo se realizó en ausencia de precipitaciones, con altas temperaturas y baja humedad ambiente. La dosis de *LAS* aplicada fue de  $1.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$  de materia activa y se realizó como en el caso del trazador. Una vez distribuida homogéneamente la disolución de *LAS* sobre la parcela se procedió a la realización de riegos sucesivos con una dotación de  $83.77 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $139.61 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$  en cada riego). En la (**Figura 5.41**) se muestra una aplicación característica.



**Figura 5.41** - Aplicación del analito en la parcela agrícola



El agua intersticial fue recogida después de la aplicación de cada riego en los hidrocaptos empleando la misma metodología descrita. Una vez colectadas las muestras, se procedió a la adición de formol para su desinfección y fueron trasladadas a una nevera en el laboratorio, donde se procedió a su análisis. Las muestras (100 mL fueron purificadas y concentradas por *SPE* y posteriormente determinadas por *HPLC/FLD*), como se indica en el capítulo de metodología. En la siguiente **Tabla 5.27** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 5.27** - Concentración de los diferentes homólogos de LAS en las muestras de agua obtenidas en los sucesivos riegos procedentes de los hidrocaptos situados a 25 cm de profundidad

Hidrocaptor	Número de riego	C <sub>10</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>11</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>12</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>13</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
1 - 25	1	1.724	4.194	2.013	2.010
1 - 25	2	0.113	0.404	0.335	0.160
1 - 25	3	0.031	0.011	0.137	0.097
1 - 25	4	0.034	0.080	0.060	0.074
1 - 25	5	< LD	< LD	< LD	< LD
1 - 25	6	< LD	< LD	< LD	< LD
1 - 25	7	< LD	< LD	< LD	< LD
2 - 25	1	1.622	4.091	2.312	1.814
2 - 25	2	0.040	0.076	0.056	0.030
2 - 25	3	0.026	0.056	0.060	0.034
2 - 25	4	< LD	< LD	< LD	< LD
2 - 25	5	< LD	< LD	< LD	< LD
2 - 25	6	< LD	< LD	< LD	< LD
2 - 25	7	< LD	< LD	< LD	< LD
3 - 25	1	1.820	3.868	1.599	2.309
3 - 25	2	0.040	0.064	0.089	0.030
3 - 25	3	0.023	0.033	0.045	0.034
3 - 25	4	< LD	< LD	< LD	< LD
3 - 25	5	< LD	< LD	< LD	< LD
3 - 25	6	< LD	< LD	< LD	< LD
3 - 25	7	< LD	< LD	< LD	< LD

De la observación de la tabla anterior, puede observarse que sólo se encontró *LAS* en las muestras de agua obtenidas de los hidrocaptos situados a 25 cm de profundidad, ya que en las muestras de agua procedentes de los hidrocaptos situados a profundidades superiores, la concentración de *LAS* encontrada fue inferior al límite de detección del método de análisis empleado.

#### **4.3 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de suelo**

Ante la ausencia de *LAS* en las muestras de agua colectadas en los hidrocaptos colocados a profundidades superiores a 50 cm, y como estudio preliminar, se decidió analizar columnas de suelo tomadas a distintos tiempos desde la aplicación del tensioactivo.

Las muestras de suelo se extrajeron perforando de forma manual con una barrena helicoidal de tipo *EIJKELKAMP*. Fueron colectadas de 10 en 10 cm hasta una profundidad de 100 cm. Como convenio en la presente Memoria, al referirse a la toma de muestra a diferentes profundidades, se procuró seleccionar una muestra representativa de cada tramo, de tal forma que por ejemplo cuando se emplea el término “Profundidad a 20 cm”, significa que ésta fue la profundidad máxima excavada y que se refiere a todo el tramo que abarca desde los 10 hasta los 20 cm.

A continuación se introdujeron en una bolsa plástica, añadiéndoles una determinada cantidad de formaldehído - 1% (m/v) - (*Figura 5.42*). En el laboratorio, se les dejaba secar a temperatura ambiente en una cámara de extracción de gases por un periodo de 24 horas. Posteriormente, se trituraba y uniformizaba el tamaño de partícula pasando por tamices (de nº 5, nº 14 y nº 30) en serie, obteniéndose un suelo seco con partículas del

tamaño de hasta 0.597 mm de diámetro, como máximo. Éste era almacenado en un frasco estéril y llevado a un refrigerador con una temperatura en torno a 4 °C hasta su determinación.



*Figura 5.42 - Colecta de las muestras de suelo en la parcela agrícola*

La toma de muestra se realizó a dos tiempos desde el último riego aplicado. La primera de ellas tuvo lugar a las dos semanas desde el último riego y la segunda a los cinco meses. En las **Tablas 5.28** y **5.29** se muestran los resultados obtenidos. En la primera de ellas se puede apreciar que los diferentes homólogos de *LAS* permanecen en los primeros 20 cm de suelo, no encontrándose ninguna cantidad significativa a profundidades superiores. Este resultado está en total concordancia con la fuerte adsorción de los diferentes homólogos del *LAS* descrita en apartados anteriores. Por otra parte en los resultados analíticos del suelo obtenidos a los cinco meses

de la aplicación del LAS a la parcela experimental, no se observa ninguna cantidad significativa de ninguno de los homólogos de LAS a ninguna de las profundidades ensayadas, lo que induce a pensar en su total biodegradación. Esta hipótesis está corroborada por el hecho de que nunca se ha encontrado ningún homólogo de LAS en los repetidos controles analíticos mensuales realizados al agua de la zona saturada.

**Tabla 5.28** - Concentración de LAS en suelo después de dos semanas de la aplicación

Profundidad (cm)	C <sub>10</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>11</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>12</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>13</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )
0 - 10	1.150	3.717	3.200	1.850
10 - 20	0.200	0.440	0.580	0.525
20 - 30	0.034	0.078	0.100	0.075
30 - 40	0.030	0.065	0.080	0.070
40 - 50	0.020	0.048	0.076	0.064
50 - 60	0.027	0.035	0.055	0.051
60 - 70	< LD	< LD	< LD	< LD
70 - 80	< LD	< LD	< LD	< LD
80 - 90	< LD	< LD	< LD	< LD
90 - 100	< LD	< LD	< LD	< LD

**Tabla 5.29** - Concentración de LAS en suelo después de cinco meses de la aplicación

Profundidad (cm)	C <sub>10</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>11</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>12</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )	C <sub>13</sub> (mg.Kg <sup>-1</sup> )
0 - 10	0.037	0.120	0.124	0.071
10 - 20	0.023	0.060	0.055	0.037
20 - 30	0.025	0.032	0.026	0.017
30 - 40	0.022	0.027	0.025	0.020
40 - 50	< LD	< LD	< LD	< LD
50 - 60	< LD	< LD	< LD	< LD
60 - 70	< LD	< LD	< LD	< LD
70 - 80	< LD	< LD	< LD	< LD
80 - 90	< LD	< LD	< LD	< LD
90 - 100	< LD	< LD	< LD	< LD

De la observación de los datos que se muestran en las anteriores tablas se puede concluir que el *LAS* permanece en un 93% retenido en la capa arable, donde se biodegrada en su práctica totalidad.

#### 4.3.1 - Estudio estacional

Una vez puesta a punto la metodología para la toma de muestra y análisis de *LAS* en suelo, se procedió al diseño de las experiencias encaminadas del estudio del comportamiento del analito en campo, según las condiciones climáticas de las diferentes estaciones del año. Teniendo en cuenta los resultados de la experiencia anterior y ante la escasa cantidad de *LAS* encontrada por debajo de los primeros 20 cm de profundidad, se decidió incrementar la cantidad de *LAS* aplicada con objeto de establecer su comportamiento en capas más profundas. En cada tratamiento se especifica la cantidad aportada (próxima a los  $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Además, esta nueva cantidad empleada supondría una exposición del suelo al *LAS* por encima de los valores habitualmente encontrados en un vehículo frecuentemente empleado como riego en esta zona, como es el agua residual, que, de no estar tratado en una EDAR, puede presentar. Este hecho representaría una mayor garantía, cuanto al comportamiento del *LAS*, en el caso de una supuesta y drástica aportación en este ambiente.

En las muestras de suelo no sólo se analizó el contenido de *LAS* sino también de la microbiota a través del recuento del números de individuos, entendidos como unidades formadoras de colonias (UFCs).

El análisis de la microbiota fue realizado en el Departamento de Microbiología del Instituto del Agua de la Universidad de Granada. A estas muestras no se les añadió formaldehído. Fueron colocadas en frascos

estériles y almacenadas en una cámara frigorífica a 4 °C hasta su análisis. Para la determinación de las UFCs, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar la posible humedad. Posteriormente se tamizaron utilizando un tamiz con un tamaño de poro de 1 mm de diámetro. Una vez tamizadas, se procedió a la siembra de las muestras en placas que contenían medio TSB diluido al 10% siendo el contenido de las mismas de 3 g·L<sup>-1</sup> de TSB y 16 g·L<sup>-1</sup> de Agar. La siembra se realizó a partir de 1 g de suelo realizándose diluciones de cada muestra en tubos de solución salina. Para el aislamiento se tomaron volúmenes de 0.1 mL de cada dilución, realizándose su extensión con espátulas de vidrio. Una vez sembradas, las placas procedentes de cada dilución se dejaron incubar durante 48 horas a 30 °C obteniéndose colonias bien diferenciadas y procediéndose a su recuento. Los datos fueron expresados en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFCs·g<sup>-1</sup> suelo).

Antes de cada aplicación de LAS, fue determinado el contenido del mismo y las UFCs iniciales en el suelo pues la cantidad residual presente podría variar.

Con relación al riego empleado en las distintas campañas de este estudio, se utilizó la misma cantidad y frecuencia de regadío habitualmente empleada en los cultivos de la Vega de Granada, consistente en un riego semanal. También y como experiencia complementaria, se llevó a cabo un tratamiento con aporte de tres riegos diarios. Antes de cada aplicación del LAS se realizó un riego preliminar para prevenir fenómenos de flujo preferencial en grietas y canales que limitarían una interacción entre la solución y el suelo. White<sup>36</sup> et col. (1986) observaron este efecto con los herbicidas bromacilo y napropamida, en ensayos en columnas de suelo intactas.

---

<sup>36</sup> White R.E, Dyson J.S, Gerstl Z., Yaron B., *Leaching of herbicides through undisturbed cores of a structure clay soil*. Soil Sci. Soc. Am. J., 50; 277-283, 1986

En las parcelas estudiadas no se había utilizado ningún tipo de pesticidas, herbicidas, insecticida en los últimos cinco años. Esta condición es muy importante, porque no sólo en estos productos pueden contener *LAS* en sus respectivas formulaciones, aportándolo al medioambiente sino que además, con su uso, se podría alterar la microbiota. También, en todas las parcelas antes de cada aplicación se procedía a la limpieza a mano de toda la vegetación superficial existente, pues éstas podrían interferir en los mecanismos de adsorción-desorción, degradación del *LAS* e interfiriendo en la influencia de algunas variables climatológicas como el índice de evaporación del agua.

En todas las campañas, la colecta del suelo fue realizada a distintas profundidades (2.0; 10.0; 20.0; 30.0; 40.0; 50.0; 60.0 cm). El tiempo empleado en cada experiencia fue el necesario para que la concentración de *LAS* alcanzase un valor próximo al determinado para el blanco (cantidad residual del *LAS* en el suelo).

Las temperaturas del suelo fueron tomadas en dos horarios distintos (a las 9:00 y 16:00 horas) durante el tiempo de ensayo. Se adoptó el valor medio de estas dos mediciones como valor diario.

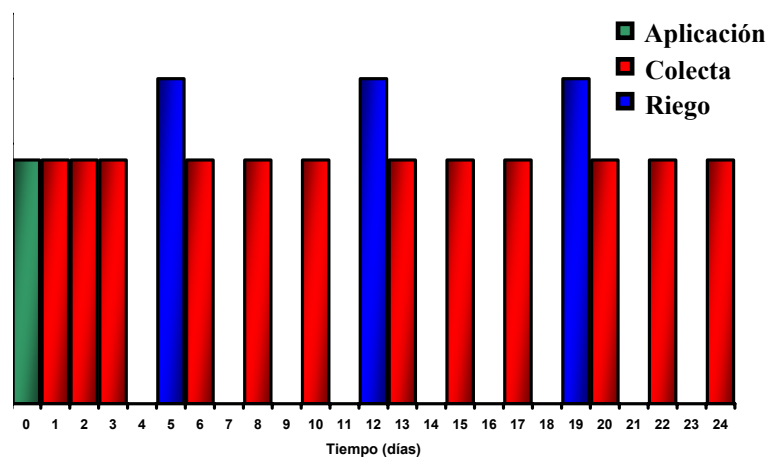
#### **A.1) Estudio realizado en el Otoño 2004**

Este primer ensayo fue importante para dilucidar tanto la frecuencia con que se deberían realizar las colectas, la profundidad y, también, determinar el tipo de agua a utilizar en los riegos, ya que en esta zona de la Vega de Granada, el regadío se hace con agua de pozo o con agua residual. En esta campaña, se prepararon dos parcelas agrícolas idénticas y contiguas, el aporte de *LAS* empleado fue exactamente igual en ambas ( $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ ), en una de ellas se emplearon riegos con agua de pozo y en la otra con agua residual.

Se realizó un riego semanal en cada parcela y las colectas de las muestras se

realizaron con frecuencia semanal, recogiendo suelo de diez en diez centímetros. Después de procesadas todas las muestras y tratados los datos, se establecieron las tasas de desaparición del *LAS* en ambas parcelas y se constató que el comportamiento del analito en el campo, regado con estos dos tipos de agua, no presentaba diferencias significativas, por lo que se optó por utilizar como agua para riego, el agua de pozo por dos motivos: estar perfectamente estudiada desde el punto de vista analítico; y la facilidad de su disponibilidad en relación al agua residual. Esta decisión elimina la variable añadida que supondría el uso de agua residual al presentar ésta fluctuaciones notables en su composición.

Por medio de este ensayo también se observó que debería haber una mayor frecuencia de toma de muestras en la primera semana de la aplicación, correspondiente al primer tramo del decaimiento exponencial del proceso ya que suministra los datos más concluyentes del comportamiento del analito en el campo. Asimismo para los futuros ensayos se estableció la necesidad de efectuar un mayor número de colectas. La frecuencia de toma de muestra puede observarse, esquemáticamente en la *Figura 5.43*.



*Figura 5.43 - Esquema genérico del tratamiento de campo*



## A.2) Estudio realizado en el Invierno 2005

En el invierno de 2005 y, debido a las dificultades climáticas presenciadas en esta campaña, el analito se comportó de forma inusual. Cabe destacar que el mes de enero, cuando se realizó este ensayo, fue el más riguroso de todos los años desde de que se empezó a determinar la temperatura en la estación meteorológica del Aeropuerto de Granada en el año 1973, alcanzándose temperaturas de hasta  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  con precipitaciones de nieve. Este hecho determinó que en los primeros días del tratamiento (primer riego), se formase una gruesa capa de hielo que impedía la lixiviación del analito. En el procesamiento de los datos se confirmó este hecho.

Como se puede observar en la **Figura 5.44**, que relaciona la concentración encontrada de LAS en el suelo en función del tiempo y en la **Figura 5.45**, que relaciona las temperaturas ambientales (mínima, media y máxima) en función del tiempo, la cantidad del analito prácticamente se mantiene constante y a un nivel muy bajo a profundidades igual o superior a los 10 cm, durante los primeros cinco días de ensayo. En el octavo día se observó un aumento de la concentración a profundidades superiores coincidiendo con la fusión de la capa superficial helada, por incremento de la temperatura ambiental (**Figura 5.45**). Debido a este hecho, no fue posible realizar el ajuste de los datos obtenidos a una cinética de primer orden y, por tanto, se decidió no considerar los datos provenientes de esta campaña. Asimismo, en la **Figura 5.45** se puede apreciar el desplazamiento de la máxima concentración de soluto con la profundidad y el tiempo, de modo similar al comportamiento de un pico cromatográfico en una columna.

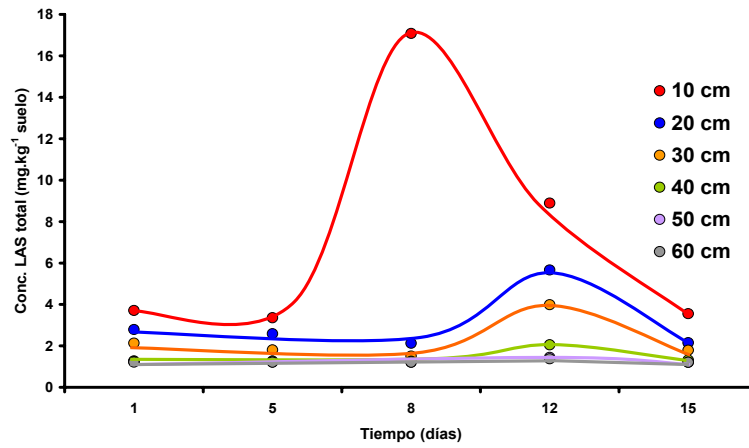


Figura 5.44 - Degradación del LAS (Invierno 2005)

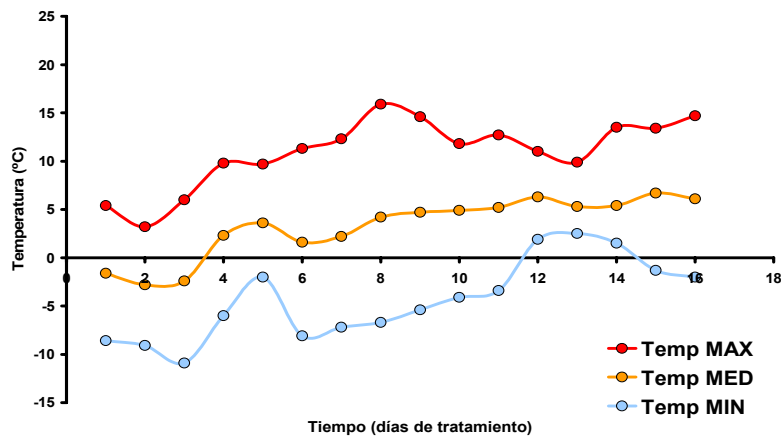
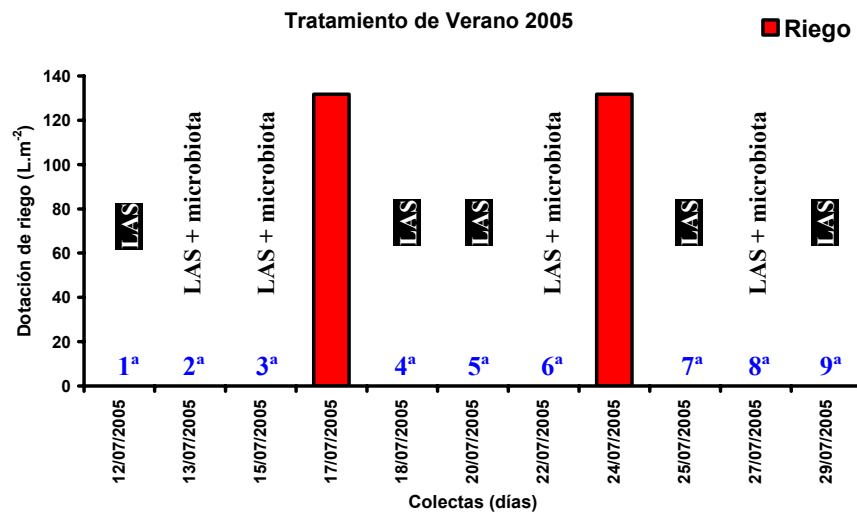


Figura 5.45 - Temperaturas durante el tratamiento de Invierno 2005

De este tratamiento se pudo constatar que el comportamiento del LAS estaba íntimamente relacionado con la temperatura, lo que hizo que fuesen colocados termómetros en distintas profundidades para un mejor seguimiento de esta variable. Se pudo comprobar que el analito, fundamentalmente, se quedaba retenido en la capa superficial.

### A.3) Verano 2005

Esta experiencia fue realizada desde el día 11/07/2005 hasta el día 29/07/2005, siendo la dosis del LAS aplicada en la parcela de  $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Para esto fueron pesadas 449.5 g de la mezcla comercial de LAS (con materia activa de 44.05%), y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue de  $131.75 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$  realizados en dos ocasiones, después de la colecta 3 y 6. Al total fueron realizadas 9 colectas. La cuantificación de la microbiota fue realizado en cuatro ocasiones: días 13/07; 15/07; 22/07 y 27/07. Abajo se puede verificar un esquema del tratamiento (*Figura 5.46*).



*Figura 5.46 - Esquema del tratamiento durante el Verano 2005*

#### A.3.1) Evolución de los parámetros ambientales

En cuanto a los datos obtenidos de las mediciones de las temperaturas (ambiental, a 10.0, 25.0 y 50.0 cm de profundidad) se observa que, como era previsible, sólo la correspondiente a la superficial mostró una gran

variabilidad. Esta observación fue común en todos los tratamientos.

Durante este periodo no hubo precipitaciones. En lo que se refiere a la evaporación diaria, se observa que, como era de esperar, la evaporación total es en este caso muy elevada, de 107.7 mm en los 19 días de experimento, equivalente a una tasa media de  $5.67 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ . Durante este periodo, la humedad ambiente de 37.7% juntamente con la temperatura ambiente produjo una elevada tasa de evaporación. No obstante, durante los días de control no se registraron eventos de viento acusado, sólo episodios medios de brisas de unos  $9.8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  de velocidad. Todos estos parámetros están representados en la **Tabla 5.30**.

**Tabla 5.30** - Parámetros ambientales para el tratamiento de Verano 2005

Parámetros ambientales			
Temperatura ambiente (°C)			Humedad ambiente (%)
<b>Máx.</b>	<b>Med.</b>	<b>Mín.</b>	
35.5	27.2	16.6	37.7
Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)			Precipitaciones diaria media (mm)
24.1			0
Temperatura media a 25 cm de profundidad (°C)			Evaporación diaria media (mm)
23.4			5.67
Temperatura media a 50 cm de profundidad (°C)			Velocidad del viento media ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
23.0			9.8

### A.3.2) Evaluación del LAS

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la siguiente figura.

Verano 2005

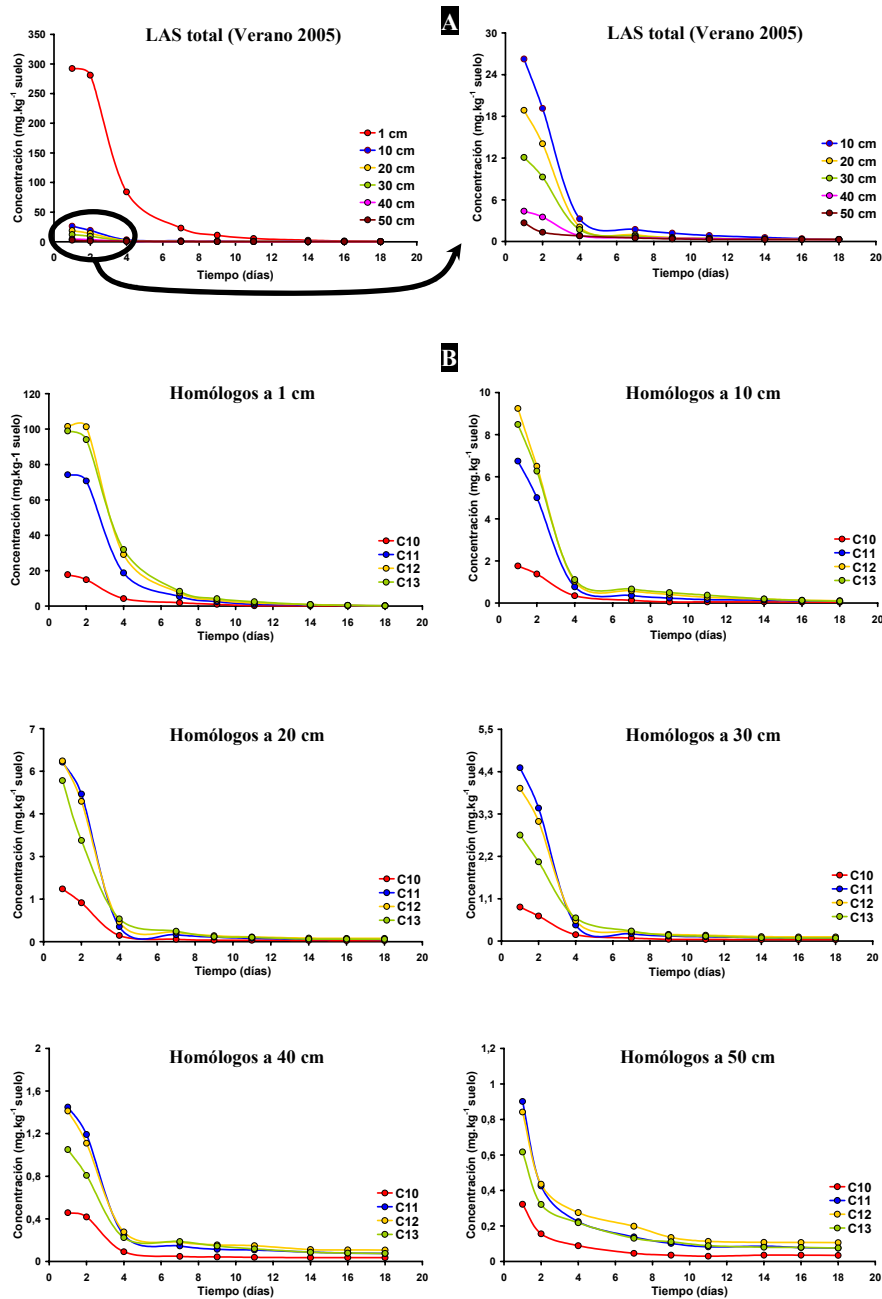


Figura 5.47 - A) Concentraciones del LAS total a distintas profundidades y tiempos. B) Concentraciones de los homólogos a distintas profundidades y tiempos

Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose los correspondientes valores de la constante de degradación ( $k$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y coeficiente de determinación ( $R^2$ ), representados en la **Tabla 5.31**.

**Tabla 5.31** - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos  $C_{10}$ ;  $C_{11}$ ;  $C_{12}$ ;  $C_{13}$  y LAS total

<b>Ensayo de campo - Verano 2005</b>							
<b>Homólogo <math>C_{10}</math></b>							
	<b>1 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>-</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.311	0.221	0.217	0.184	0.143	0.114	-
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	95.08	82.22	75.86	79.37	70.48	70.05	-
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.226	3.136	3.194	3.763	4.834	6.102	-
<b>Homólogo <math>C_{11}</math></b>							
	<b>1 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>-</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.360	0.247	0.249	0.230	0.164	0.127	-
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97.83	85.85	79.48	78.13	77.80	78.09	-
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	1.926	2.812	2.784	3.008	4.219	5.445	-
<b>Homólogo <math>C_{12}</math></b>							
	<b>1 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>-</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.368	0.246	0.231	0.206	0.142	0.109	-
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	98.52	88.74	80.88	78.94	76.84	80.99	-
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	1.884	2.813	3.003	3.371	4.885	6.359	-
<b>Homólogo <math>C_{13}</math></b>							
	<b>1 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>-</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.368	0.249	0.242	0.211	0.145	0.110	-
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.43	92.44	86.73	87.66	84.41	83.08	-
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	1.883	2.783	2.860	3.282	4.767	6.319	-
<b>LAS total</b>							
	<b>1 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>-</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.361	0.245	0.238	0.213	0.150	0.115	-
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	98.77	89.42	81.96	81.26	78.77	79.73	-
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	1.921	2.831	2.912	3.251	4.630	6.033	-

En las *Figuras 5.48* y *5.49* se muestra el comportamiento del LAS y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), con las distintas profundidades estudiadas.

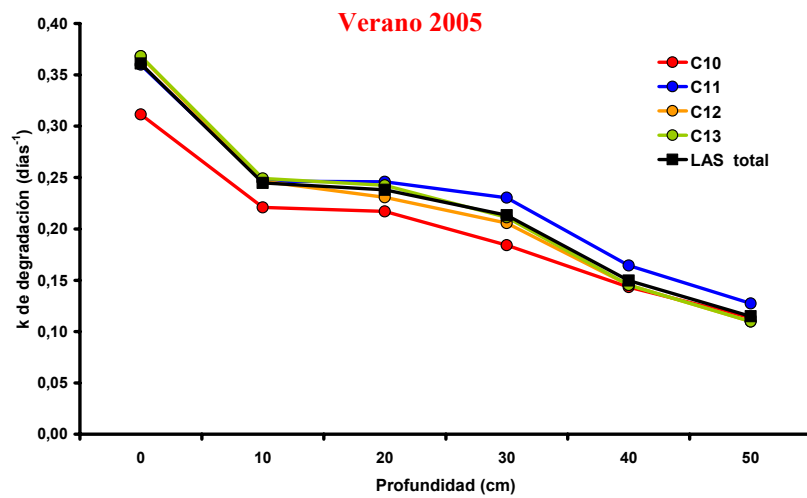


Figura 5.48 - Relación entre la constante de degradación y la profundidad

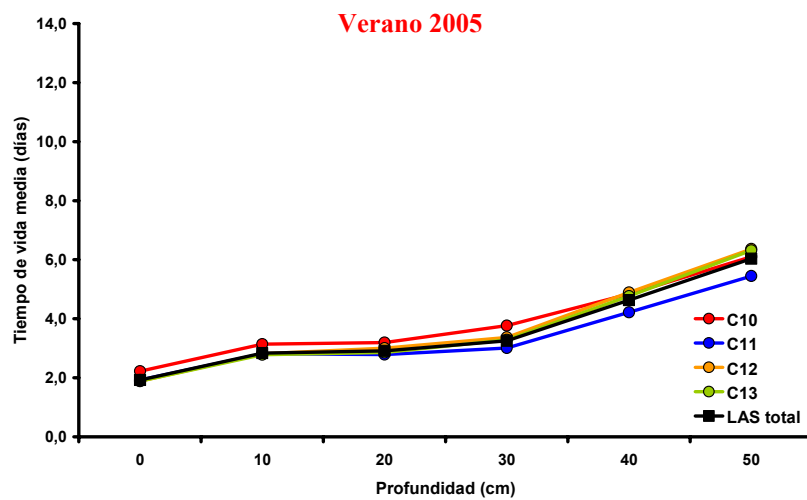
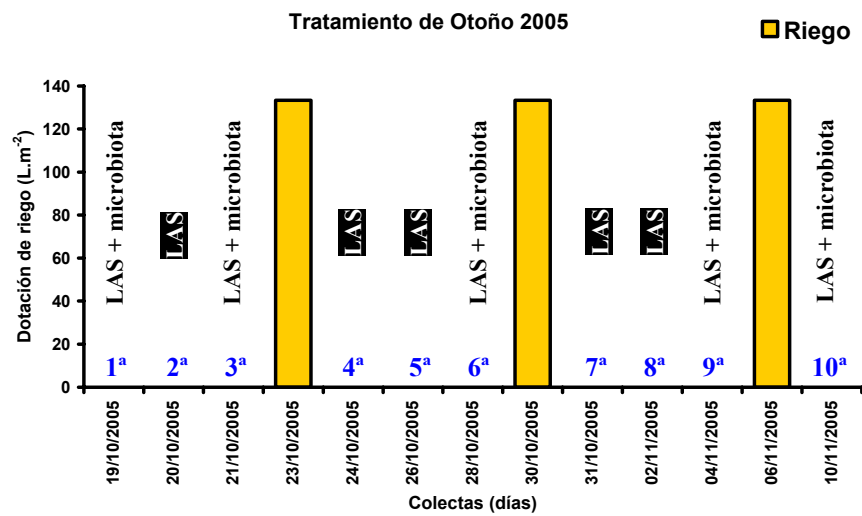


Figura 5.49 - Relación entre el tiempo de vida media y la profundidad

**A.4) Otoño 2005**

Esta experiencia fue realizada desde el día 18/10/2005 hasta el día 10/11/2005, siendo la dosis del LAS aplicada en la parcela de cerca de 5.5 g·m<sup>-2</sup>. Para esto fueron pesadas 449.5 g de la mezcla comercial de LAS (con materia activa de 44.05%), y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue de 133.31 L·m<sup>-2</sup> realizados en tres ocasiones, después de la colecta 3, 6 y 9. Al total fueron realizadas 10 colectas. La cuantificación de la microbiota fue realizado en cinco ocasiones: días 19/10; 21/10; 26/10; 04/11; 10/11. Abajo se puede verificar un esquema del tratamiento (*Figura 5.50*).



*Figura 5.50 - Esquema del tratamiento durante el Otoño 2005*

**A.4.1) Evolución de los parámetros ambientales**

En este periodo hubo precipitaciones solamente por lluvias en los días



19/10; 29/10; 31/10; 01/11, sumando al total 22.5 mm. En lo que se refiere a la evaporación diaria, se ha observado un valor total de 43.0 mm en los 23 días de experimento, equivalente a una tasa media de  $1.87 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ .

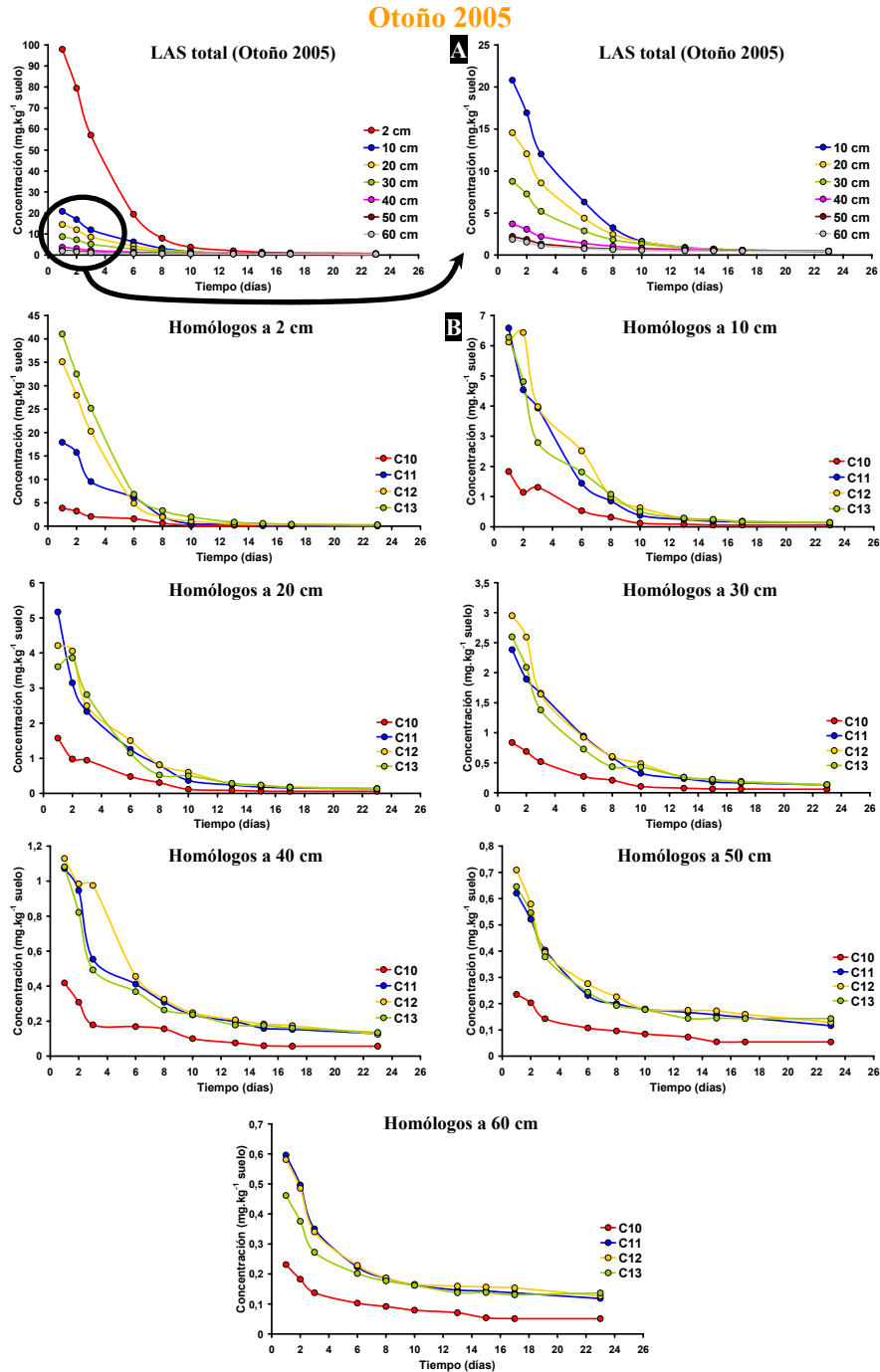
Durante este periodo, con la humedad ambiente de 63.7%, sumando a una temperatura más amena, condujo a una menor tasa de evaporación. Tampoco se registraron eventos de viento acusado, con episodios medios de brisas de unos  $6.9 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  de velocidad. Todos estos parámetros están representados en la **Tabla 5.32**.

**Tabla 5.32** - Parámetros ambientales para el tratamiento de Otoño 2005

Parámetros ambientales			
Temperatura ambiente (°C)			Humedad ambiente (%)
Máx.	Med.	Mín.	
21.4	14.6	6.9	63.7
Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)			Precipitaciones diaria media (mm)
16.3			0.98
Temperatura media a 25 cm de profundidad (°C)			Evaporación diaria media (mm)
16.5			1.87
Temperatura media a 50 cm de profundidad (°C)			Velocidad del viento media ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
18.3			6.9

#### A.4.2) Evaluación del LAS

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la siguiente figura.



**Figura 5.51 - A)** Concentraciones del LAS total a distintas profundidades y tiempos. **B)** Concentraciones de los homólogos a distintas profundidades y tiempos

Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose los correspondientes valores de la constante de degradación ( $k$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y coeficiente de determinación ( $R^2$ ), representados en la **Tabla 5.33**.

**Tabla 5.33** - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos  $C_{10}$ ;  $C_{11}$ ;  $C_{12}$ ;  $C_{13}$  y LAS total

<b>Ensayo de campo - Otoño 2005</b>							
<b>Homólogo <math>C_{10}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.244	0.197	0.178	0.147	0.100	0.073	0.071
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	95.40	97.02	97.39	97.90	93.71	85.60	85.52
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.842	3.522	3.890	4.712	6.959	9.482	9.722
<b>Homólogo <math>C_{11}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.257	0.204	0.176	0.152	0.107	0.073	0.072
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	95.91	97.81	98.59	97.58	93.44	85.31	81.64
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.696	3.442	3.932	4.572	6.466	9.443	9.627
<b>Homólogo <math>C_{12}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.301	0.227	0.204	0.165	0.113	0.094	0.074
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	98.40	98.08	96.08	95.42	89.39	86.55	86.50
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.304	3.055	3.406	4.191	6.150	7.366	9.431
<b>Homólogo <math>C_{13}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.326	0.249	0.221	0.189	0.137	0.104	0.094
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	96.02	97.37	97.97	97.26	92.70	86.99	86.06
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.126	2.784	3.136	3.667	5.059	6.665	7.374
<b>LAS total</b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.303	0.237	0.211	0.174	0.121	0.090	0.082
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	96.71	97.69	97.57	96.84	92.20	86.11	84.79
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.289	2.920	3.285	3.986	5.733	7.719	8.453

En las **Figuras 5.52** y **5.53** se muestra el comportamiento del LAS y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), con las distintas profundidades estudiadas.

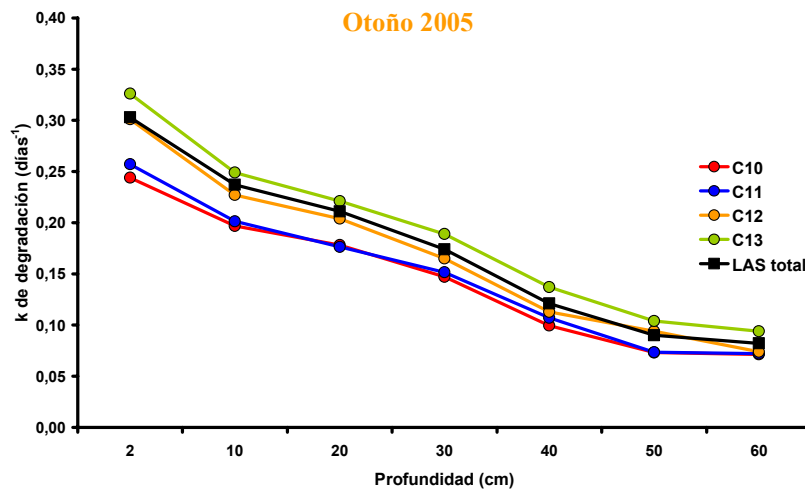


Figura 5.52 - Relación entre la constante de degradación y la profundidad

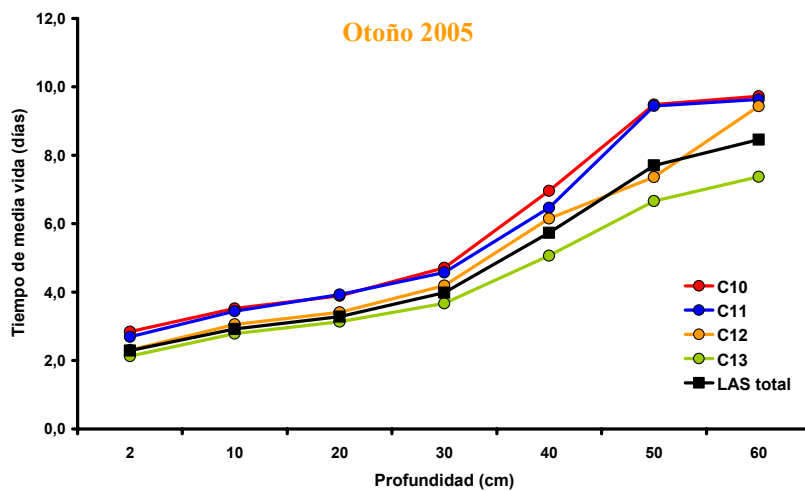
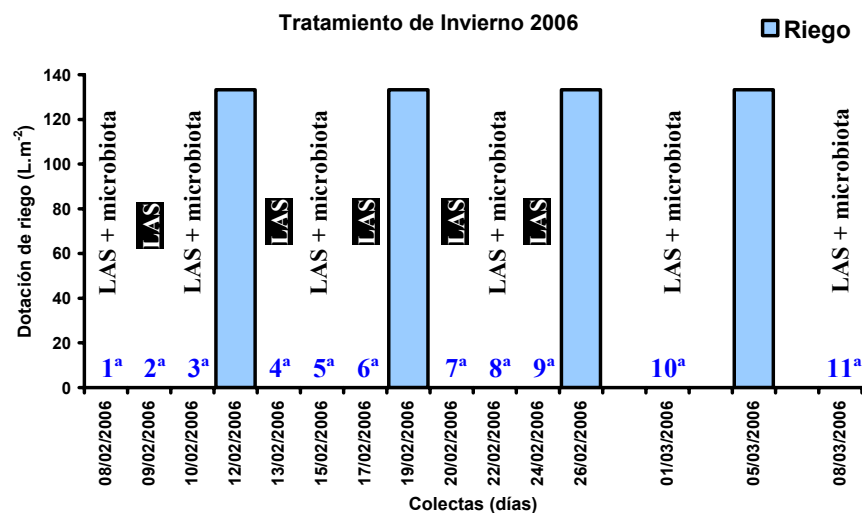


Figura 5.53 - Relación entre el tiempo de vida media y la profundidad

### A.5) Invierno 2006

Esta experiencia fue realizada desde el día 07/02/2006 hasta el día 08/03/2006, siendo la dosis del *LAS* aplicada en la parcela de cerca de  $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Para esto fueron pesadas 449.5 g de la mezcla comercial de *LAS* (con materia activa de 44.05%), y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue de  $133.31 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$  realizados en cuatro ocasiones, después de la colecta 3, 6, 9 y 10. Al total fueron realizadas 11 colectas. La cuantificación de la microbiota fue realizado en seis ocasiones: días 08/02; 10/02; 15/02; 22/02; 01/03; 08/03. Abajo se puede verificar un esquema del tratamiento (*Figura 5.54*).



*Figura 5.54 - Esquema del tratamiento durante el Invierno 2006*

#### A.5.1) Evolución de los parámetros ambientales

En este periodo hubo precipitaciones debido a lluvia en los días 10/02; 12/02; 17/02; 19/02; 20/02; 21/02; 26/02; 27/02; 05/03, y también debido

a nieve en el día 26/02, sumando al total 46.6 mm. En lo que se refiere a la evaporación diaria, se ha observado un valor total de 40.2 mm en los 29 días de experimento, equivalente a una tasa media de  $1.39 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ .

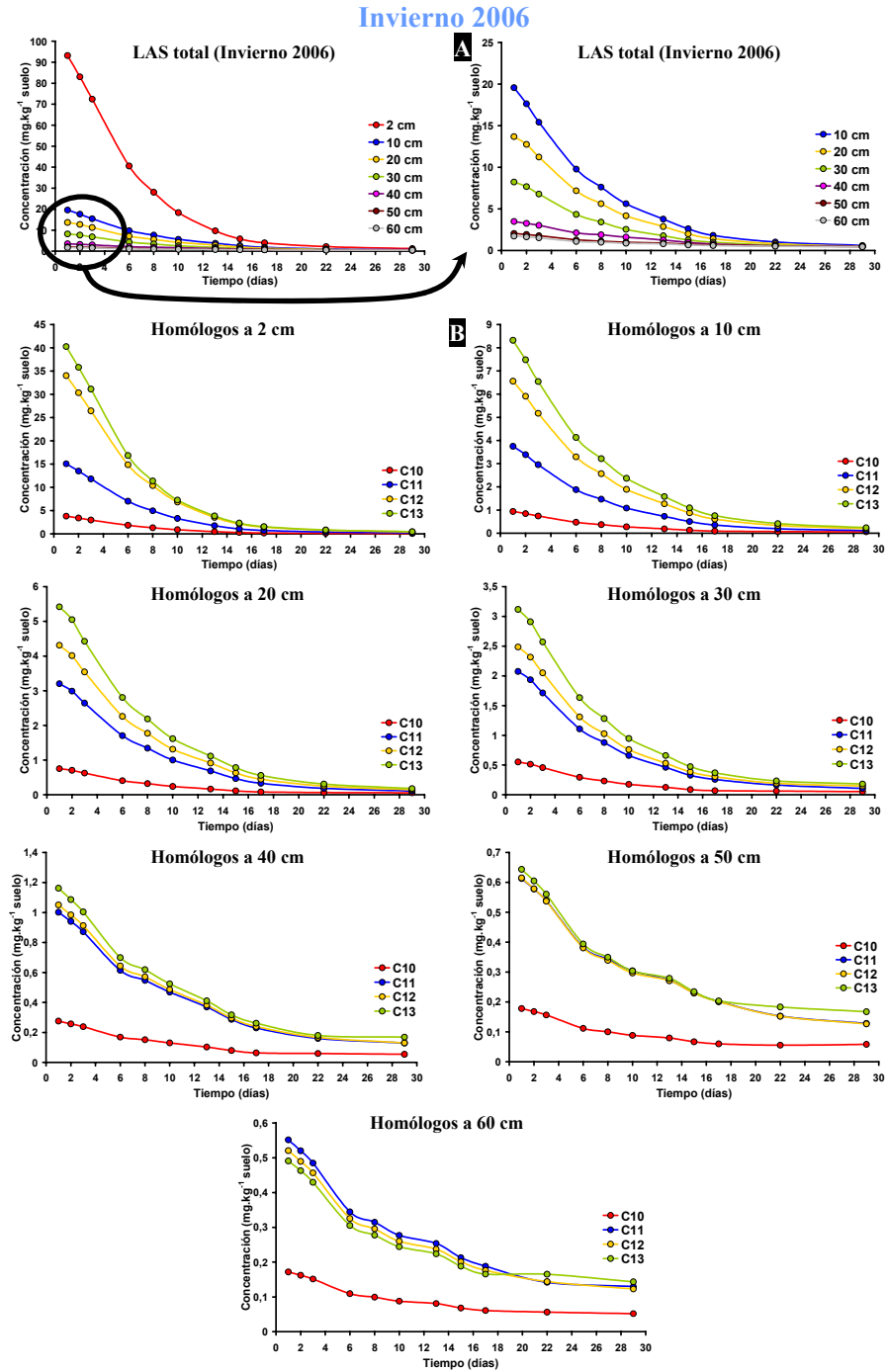
Durante este periodo, con la humedad ambiente más alta de todas las estaciones evaluadas (77.4%) y, también, con las temperaturas más bajas, indujo a una situación donde las pérdidas por evaporación fueron anuladas por las precipitaciones ocurridas. Tampoco se registraron eventos de viento acusado, con episodios medios de brisas de unos  $7.6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  de velocidad. Todos estos parámetros están representados en la **Tabla 5.34**.

**Tabla 5.34** - Parámetros ambientales para el tratamiento de Invierno 2006

Parámetros ambientales			
Temperatura ambiente (°C)			Humedad ambiente (%)
<b>Máx.</b>	<b>Med.</b>	<b>Mín.</b>	
14.0	7.2	1.5	77.4
Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)			Precipitaciones diaria media (mm)
8.6			1.61
Temperatura media a 25 cm de profundidad (°C)			Evaporación diaria media (mm)
8.7			1.39
Temperatura media a 50 cm de profundidad (°C)			Velocidad del viento media ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
9.4			7.6

#### A.5.2) Evaluación del LAS

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la siguiente figura.



**Figura 5.55** - A) Concentraciones del LAS total a distintas profundidades y tiempos. B) Concentraciones de los homólogos a distintas profundidades y tiempos

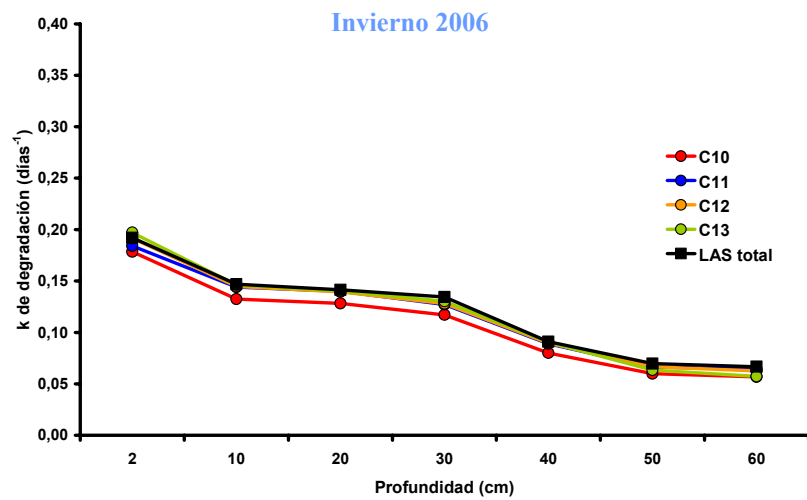
Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose los correspondientes valores de la constante de degradación ( $k$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y coeficiente de determinación ( $R^2$ ), representados en la **Tabla 5.35**.

**Tabla 5.35** - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos  $C_{10}$ ;  $C_{11}$ ;  $C_{12}$ ;  $C_{13}$  y LAS total

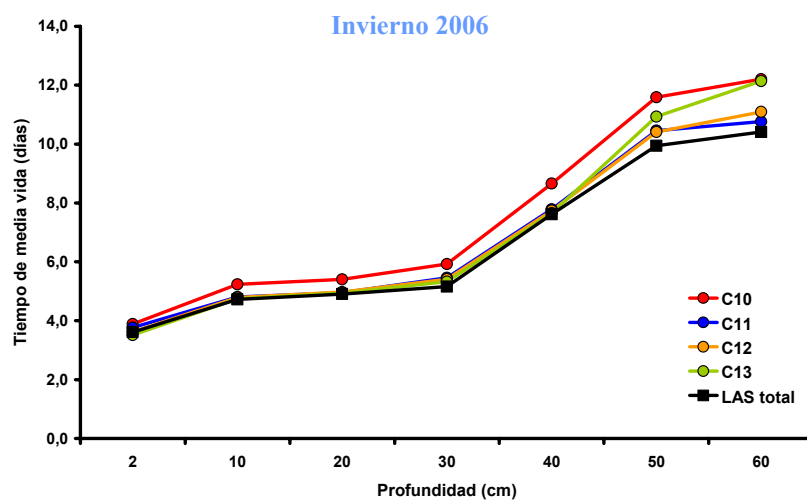
<b>Ensayo de campo - Invierno 2006</b>							
<b>Homólogo <math>C_{10}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.178	0.132	0.128	0.117	0.080	0.060	0.057
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.26	98.69	98.49	97.19	97.54	95.56	95.61
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.885	5.235	5.407	5.924	8.654	11.591	12.203
<b>Homólogo <math>C_{11}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.184	0.144	0.140	0.127	0.089	0.066	0.062
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.34	99.82	99.73	99.61	99.62	98.58	98.43
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.765	4.810	4.951	5.454	7.788	10.455	11.108
<b>Homólogo <math>C_{12}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.192	0.145	0.139	0.128	0.090	0.067	0.063
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.34	99.81	99.79	99.55	99.67	98.32	97.82
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.620	4.790	4.972	5.411	7.736	10.408	10.968
<b>Homólogo <math>C_{13}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.197	0.146	0.140	0.130	0.091	0.063	0.057
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.35	99.81	99.83	99.57	99.69	96.04	93.61
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.517	4.744	4.940	5.328	7.651	10.933	12.139
<b>LAS total</b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.192	0.147	0.141	0.134	0.091	0.070	0.067
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99.36	99.74	99.69	99.88	99.54	98.04	97.92
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.612	4.722	4.906	5.157	7.617	9.945	10.41



En las **Figuras 5.56** y **5.57** se muestra el comportamiento del *LAS* y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), con las distintas profundidades estudiadas.



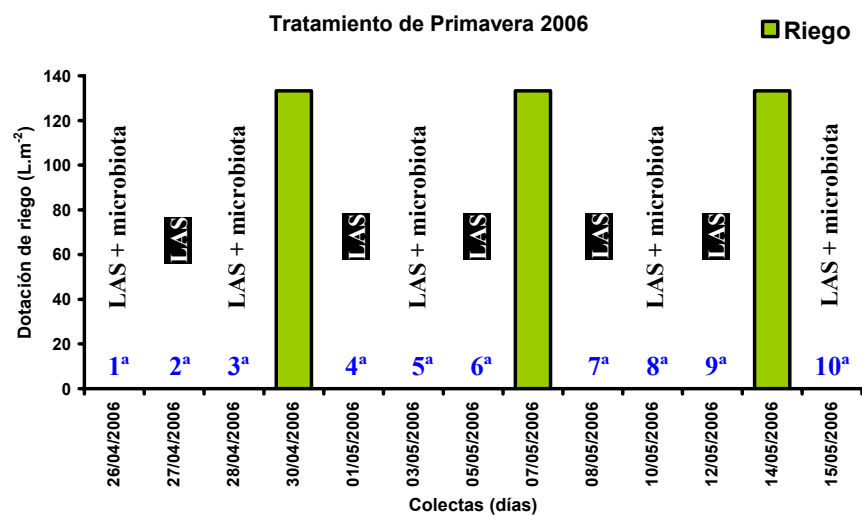
**Figura 5.56** - Relación entre la constante de degradación y la profundidad



**Figura 5.57** - Relación entre el tiempo de vida media y la profundidad

### A.6) Primavera 2006

Esta experiencia fue realizada desde el día 25/04/2006 hasta el día 15/05/2006, siendo la dosis del *LAS* aplicada en la parcela de cerca de  $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Para esto fueron pesadas 413.0 g de la mezcla comercial de *LAS* (con materia activa de 47.95%), y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue de  $133.31 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$  realizados en cuatro ocasiones, después de la colecta 3, 6 y 9. Al total fueron realizadas 10 colectas. La cuantificación de la microbiota fue realizado en cinco ocasiones: días 26/04; 28/04; 03/05; 10/05; 15/05. Abajo se puede verificar un esquema del tratamiento (*Figura 5.58*).



*Figura 5.58* - Esquema del tratamiento durante la Primavera 2006

#### A.6.1) Evolución de los parámetros ambientales

En este periodo hubo precipitaciones solamente por lluvias en los días 29/04; 03/05; 04/05; 05/05; 06/05; 07/05; 12/05, sumando al total 38.9 mm.

En lo que se refiere a la evaporación diaria, se ha observado un valor total de 79.1 mm en los 20 días de experimento, equivalente a una tasa media de 3.96 mm·día<sup>-1</sup>.

Durante este periodo, mismo con la humedad ambiente de 68.3% pero con una temperatura relativamente más elevada que los últimos dos tratamientos, condujo a una tasa de evaporación superior cuando relacionada con la del invierno 2006 y con la del otoño 2005. Tampoco se registraron eventos de viento acusado, con episodios medios de brisas de unos 7.2 m·s<sup>-1</sup> de velocidad. Todos estos parámetros están representados en la **Tabla 5.36**.

**Tabla 5.36** - Parámetros ambientales para el tratamiento de primavera 2006

Parámetros ambientales			
Temperatura ambiente (°C)			Humedad ambiente (%)
Máx.	Med.	Mín.	
26.6	17.4	10.1	68.3
Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)			Precipitaciones diaria media (mm)
18.9			1.95
Temperatura media a 25 cm de profundidad (°C)			Evaporación diaria media (mm)
20.4			3.96
Temperatura media a 50 cm de profundidad (°C)			Velocidad del viento media (m·s <sup>-1</sup> )
21.8			7.2

#### A.6.2) Evaluación del LAS

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la siguiente figura.

Primavera 2006

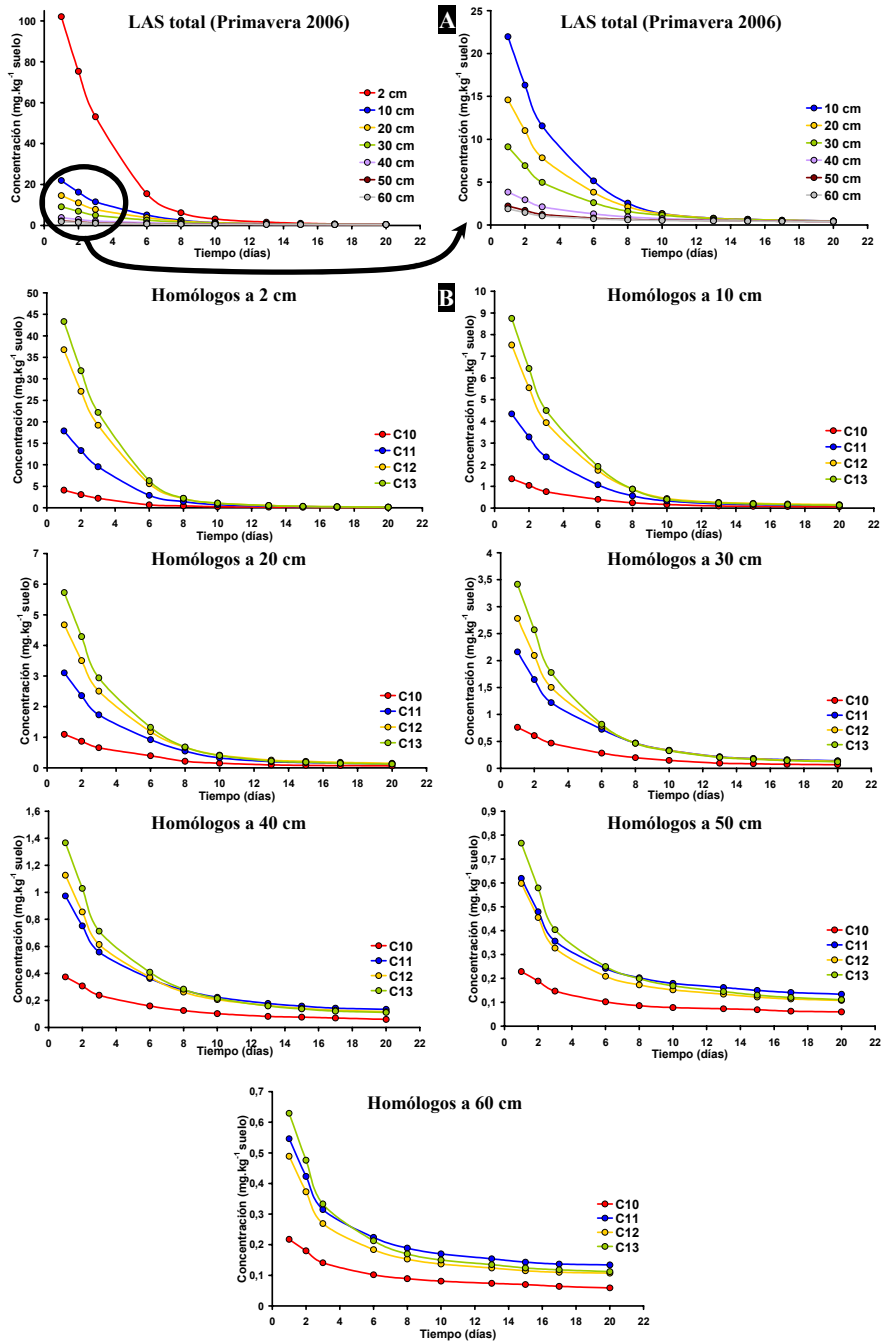


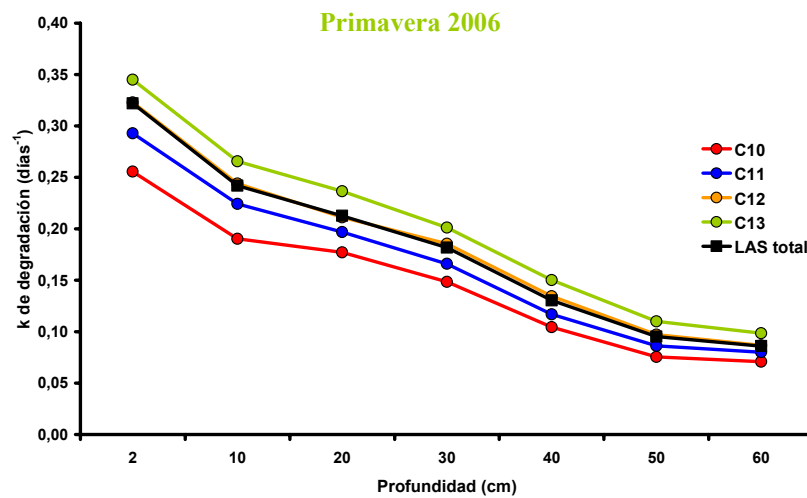
Figura 5.59 - A) A) Concentraciones del LAS total a distintas profundidades y tiempos. B) Concentraciones de los homólogos a distintas profundidades y tiempos

Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose los correspondientes valores de la constante de degradación ( $k$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y coeficiente de determinación ( $R^2$ ), representados en la **Tabla 5.37**.

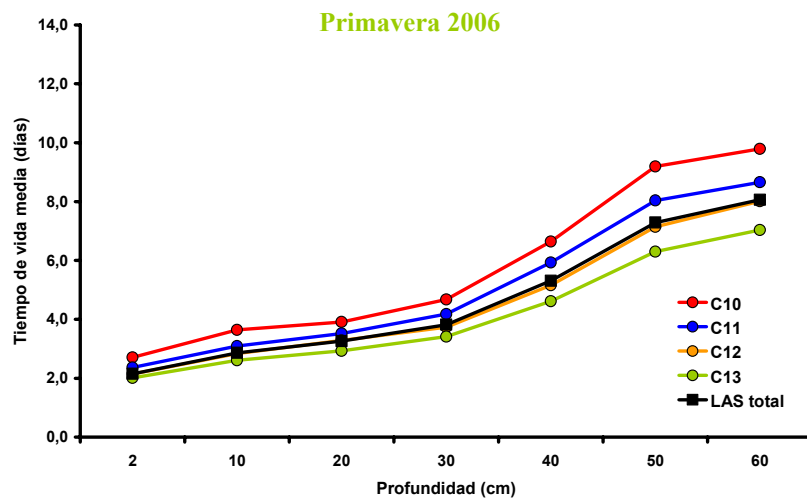
**Tabla 5.37** - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos  $C_{10}$ ;  $C_{11}$ ;  $C_{12}$ ;  $C_{13}$  y LAS total

<b>Ensayo de campo - Primavera 2006</b>							
<b>Homólogo <math>C_{10}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.256	0.190	0.177	0.148	0.104	0.075	0.071
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97.58	97.55	97.28	97.55	94.56	87.79	88.98
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.712	3.644	3.912	4.674	6.646	9.193	9.790
<b>Homólogo <math>C_{11}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.293	0.224	0.197	0.166	0.117	0.086	0.080
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97.86	96.74	97.28	97.49	94.53	87.99	87.16
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.367	3.090	3.522	4.178	5.929	8.041	8.654
<b>Homólogo <math>C_{12}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.323	0.244	0.211	0.185	0.134	0.097	0.087
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97.99	96.75	96.99	96.85	94.29	88.44	86.39
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.147	2.841	3.285	3.739	5.157	7.138	8.013
<b>Homólogo <math>C_{13}</math></b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.345	0.266	0.237	0.203	0.150	0.110	0.099
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	98.08	96.82	97.31	96.26	95.04	90.06	86.75
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.010	2.610	2.931	3.413	4.615	6.296	7.037
<b>LAS total</b>							
	<b>2 cm</b>	<b>10 cm</b>	<b>20 cm</b>	<b>30 cm</b>	<b>40 cm</b>	<b>50 cm</b>	<b>60 cm</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.322	0.242	0.213	0.182	0.131	0.095	0.086
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97.92	96.80	97.12	96.82	94.48	88.66	86.94
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.153	2.865	3.260	3.817	5.311	7.289	8.060

En las **Figuras 5.60** y **5.61** se muestra el comportamiento del LAS y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), con las distintas profundidades estudiadas.



**Figura 5.60** - Relación entre la constante de degradación y la profundidad



**Figura 5.61** - Relación entre el tiempo de vida media y la profundidad

### A.7) Riegos Sucesivos

En esta experiencia se realizaron riegos sucesivos (3 al día) durante un corto periodo de tiempo. Se desarrolló desde el día 20/06/2006 hasta el día 23/06/2006, siendo la dosis del LAS aplicada en la parcela de  $5.5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Para esto fueron pesados 448.0 g de la mezcla comercial de LAS (con materia activa de 44.20%), y aplicados a la parcela. La dotación de riego fue de  $133.31 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$ , realizados en diez ocasiones, después de cada colecta. En total se realizaron 11 colectas. A continuación se resume un esquema del tratamiento (*Figura 5.62*).

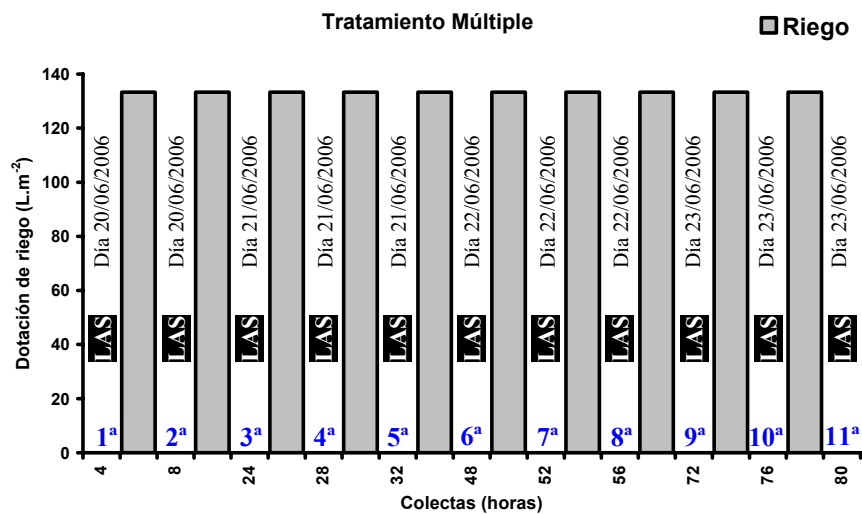


Figura 5.62 - Esquema del tratamiento

#### A.7.1) Evolución de los parámetros ambientales

En este periodo hubo precipitaciones solamente por lluvias en un único

día (21/06), con la cantidad de 0.5 mm. En lo que se refiere a la evaporación diaria, se ha observado un valor total de 25 mm en los 4 días de experimento, equivalente a una tasa media de  $6.25 \text{ mm}\cdot\text{día}^{-1}$ .

Durante este periodo, sumando la humedad ambiente relativamente más baja que los últimos tres tratamientos (48.3%) además de temperaturas altas, condujo a la tasa de evaporación más acentuada cuando relacionada con todos los demás tratamientos. Tampoco se registraron eventos de viento acusado, con episodios medios de brisas de unos  $6.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  de velocidad. Todos estos parámetros están representados en la **Tabla 5.38**.

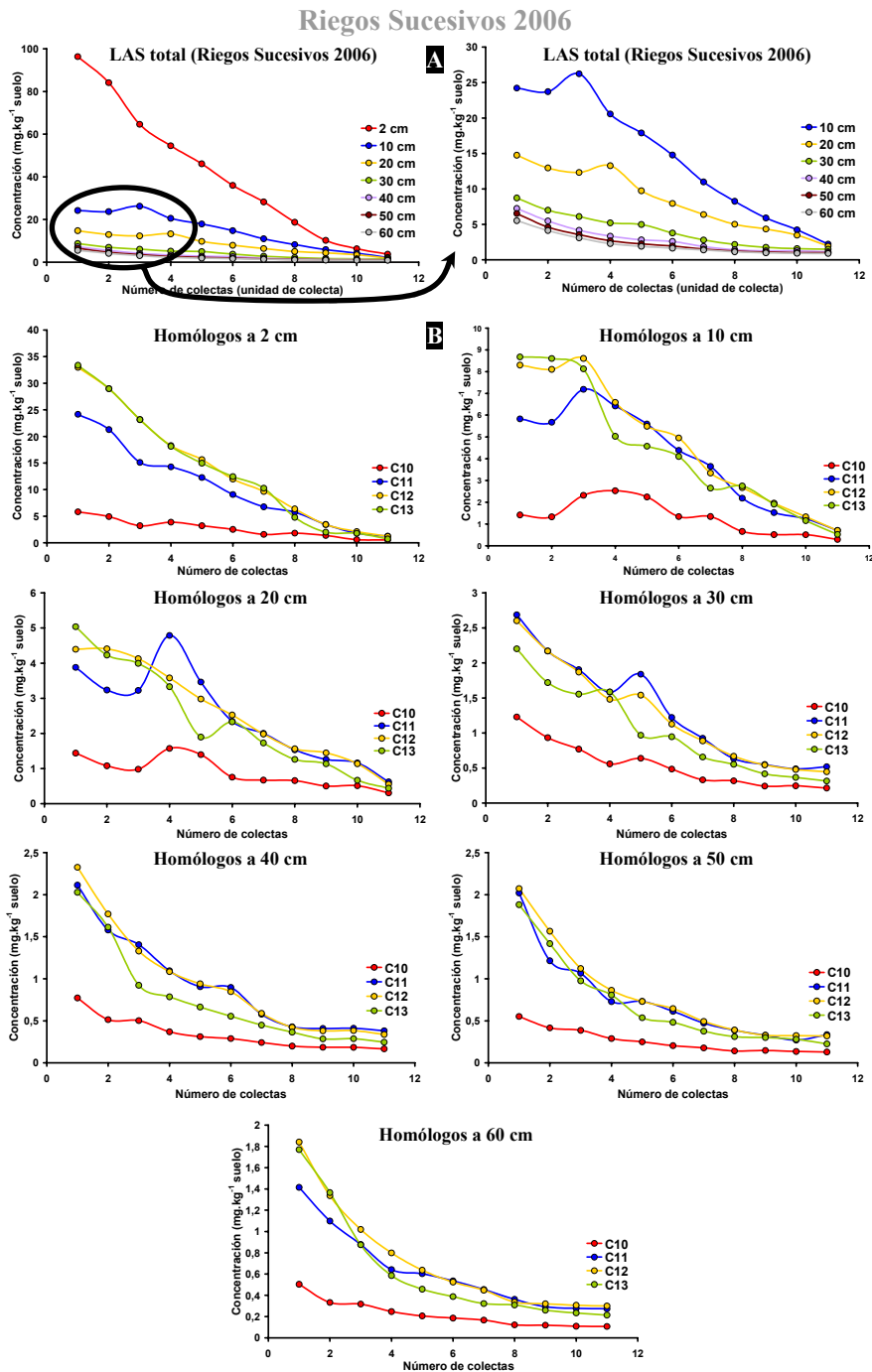
**Tabla 5.38** - Parámetros ambientales para el tratamiento con riegos sucesivos

Parámetros ambientales			
Temperatura ambiente (°C)			Humedad ambiente (%)
Máx.	Med.	Mín.	
35.7	25.6	16.2	48.3
Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)			Precipitaciones diaria media (mm)
23.3			0.13
Temperatura media a 25 cm de profundidad (°C)			Evaporación diaria media (mm)
22.5			6.25
Temperatura media a 50 cm de profundidad (°C)			Velocidad del viento media ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )
22.1			6.5

#### A.7.2) Evaluación del LAS

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la siguiente figura.





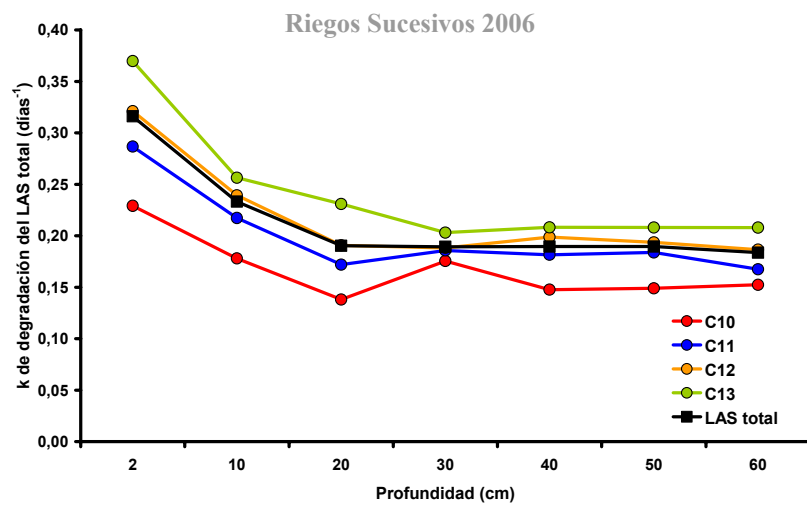
**Figura 5.63** - A) Concentraciones del LAS total a distintas profundidades y tiempos. B) Concentraciones de los homólogos a distintas profundidades y tiempos

Los datos obtenidos fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose los correspondientes valores de la constante de degradación ( $k$ ), tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) y coeficiente de determinación ( $R^2$ ), representados en la **Tabla 5.39**.

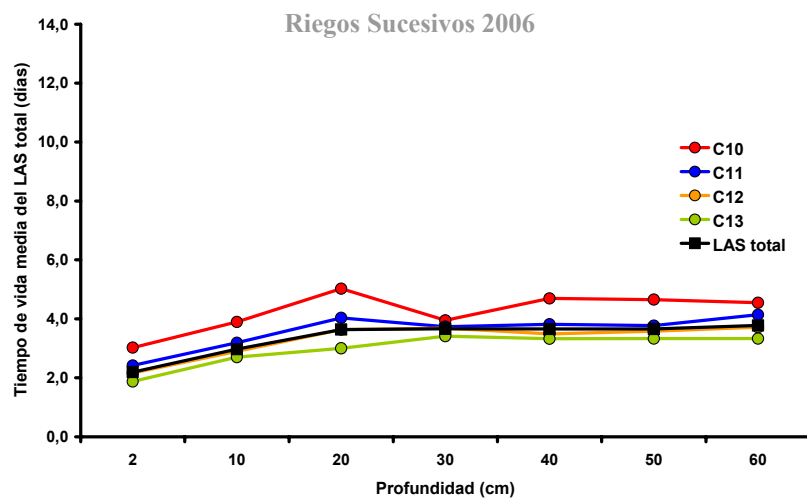
**Tabla 5.39** - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos  $C_{10}$ ;  $C_{11}$ ;  $C_{12}$ ;  $C_{13}$  y LAS total

Ensayo con Riegos Sucesivos 2006							
Homólogo $C_{10}$							
	2 cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
$k$ (días <sup>-1</sup> )	0.229	0.178	0.138	0.176	0.148	0.149	0.152
$R^2$ (%)	91.72	67.18	79.20	96.64	95.13	95.20	95.79
$t_{1/2}$ (días)	3.026	3.894	5.023	3.950	4.693	4.652	4.548
Homólogo $C_{11}$							
	2 cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
$k$ (días <sup>-1</sup> )	0.287	0.217	0.172	0.186	0.182	0.184	0.168
$R^2$ (%)	94.46	84.45	83.67	94.76	95.85	93.91	97.24
$t_{1/2}$ (días)	2.419	3.190	4.032	3.733	3.819	3.771	4.138
Homólogo $C_{12}$							
	2 cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
$k$ (días <sup>-1</sup> )	0.320	0.239	0.191	0.188	0.199	0.194	0.187
$R^2$ (%)	94.51	91.50	92.13	98.27	97.27	96.03	95.10
$t_{1/2}$ (días)	2.165	2.897	3.635	3.683	3.487	3.580	3.717
Homólogo $C_{13}$							
	2 cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
$k$ (días <sup>-1</sup> )	0.370	0.256	0.231	0.203	0.208	0.208	0.208
$R^2$ (%)	92.06	91.62	94.93	97.96	96.25	95.57	92.64
$t_{1/2}$ (días)	1.875	2.703	3.002	3.413	3.329	3.331	3.332
LAS total							
	2 cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm	60 cm
$k$ (días <sup>-1</sup> )	0.316	0.233	0.190	0.189	0.190	0.190	0.184
$R^2$ (%)	94.43	90.24	92.88	98.13	97.11	96.05	95.75
$t_{1/2}$ (días)	2.194	2.972	3.640	3.662	3.658	3.656	3.775

En las **Figuras 5.64** y **5.65** se muestra el comportamiento del LAS y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación ( $k$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), con las distintas profundidades estudiadas.



**Figura 5.64** - Relación entre la constante de degradación y la profundidad

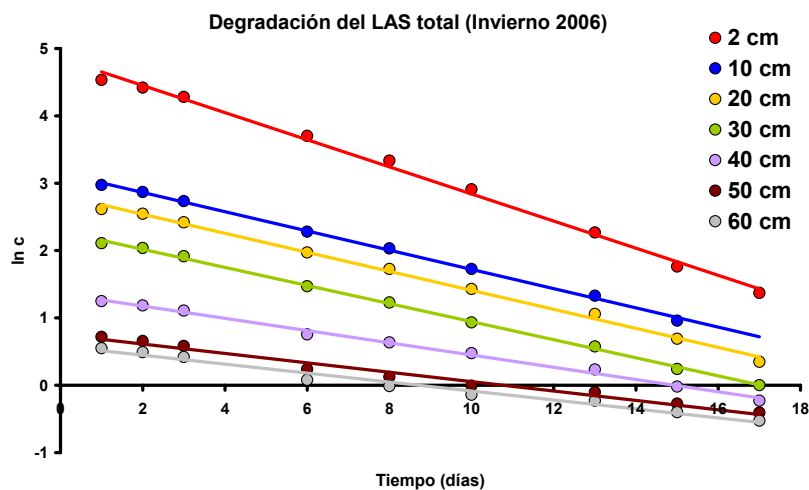


**Figura 5.65** - Relación entre el tiempo de vida media y la profundidad

### 4.3.2 - Estudio comparado de los resultados de campo

Analizando los datos de concentración de *LAS* en suelo a las distintas profundidades ensayadas, en todas las campañas estudiadas, se puede constatar que la desaparición del *LAS* en suelo es relativamente rápida, siendo las cantidades finales encontradas muy bajas transcurrido un periodo de tiempo medio de tres semanas desde su aplicación.

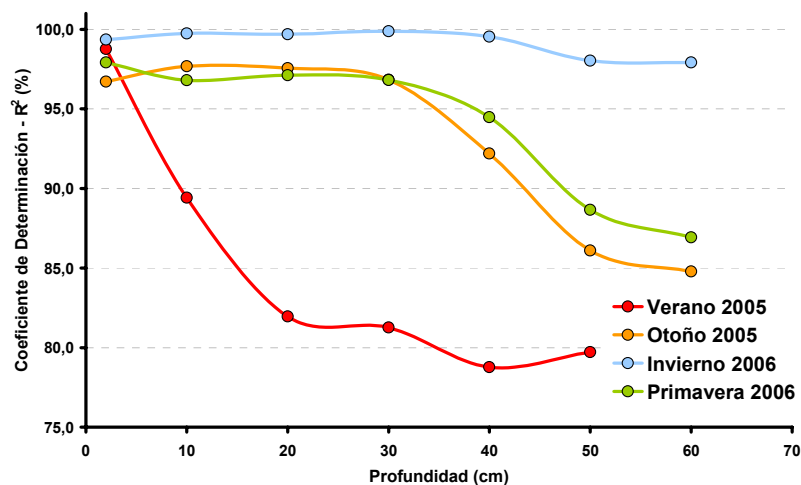
En todos los casos las curvas de degradación se ajustan a una cinética de primer orden. Al establecer una relación entre las constantes de degradación ( $k$ ) para el *LAS* total y sus homólogos, con las distintas profundidades estudiadas, se constata, que la velocidad de degradación es mayor cuanto más cerca de la superficie se encuentran los analitos, de forma que  $k_{2\text{cm}} > k_{10\text{cm}} > k_{20\text{cm}} > k_{30\text{cm}} > k_{40\text{cm}} > k_{50\text{cm}} > k_{60\text{cm}}$ . Esta tendencia se cumple en todos los tratamientos realizados (**Verano 2005**, **Otoño 2005**, **Invierno 2006**, **Primavera 2006**, **Riego Sucesivo 2006**). A modo representativo, en la **Figura 5.66** se muestran los valores del  $\ln c$  de la concentración de *LAS* total frente al tiempo a las distintas profundidades en el tratamiento del Invierno 2006.



**Figura 5.66** - Degradación del *LAS* total durante el Invierno 2006

De la observación de esta figura se puede comprobar el excelente ajuste de los datos a una cinética de degradación de primer orden así como el hecho de que el LAS se degrada más rápidamente en las capas superficiales (mayor pendiente de las rectas).

Los mejores ajustes se obtuvieron en la campaña del **Invierno 2006** y los peores en el **Verano 2005**. Posiblemente este último resultado puede atribuirse a la sequedad del terreno debida a la elevada tasa de evaporación registrada, la cual impedía que el agua de riego penetrase y dificultase la acción bacteriana. Los datos de ajuste de todas las campañas se muestran en la siguiente figura. En ella se puede observar que en todas las experiencias el valor del coeficiente de determinación es superior a 78%.



*Figura 5.67 - Ajuste de los datos de todas las campañas para el LAS total*

De acuerdo con Beulke & Brown<sup>37</sup> (2001), en un estudio realizado evaluando los parámetros de degradación de un pesticida en matrices

<sup>37</sup> Beulke S., Brown C.D., *Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling*. Biol. Fertil. Soils, 33; 558-564, 2001

ambientales, donde valores de  $R^2 > 70.0\%$  podrían ser considerados como resultados aceptables. Otros estudios analizando la degradación de pesticidas también en condiciones medioambientales, comentan que esta falta de ajuste puede ser achacada a la heterogeneidad de las muestras de suelos (Gustafson & Holden<sup>38</sup>, 1990; Beulke<sup>39</sup> *et al.*, 2001) y a otros muchos factores (contenido de agua, presencia de superficies catalíticas o la variabilidad en la población microbiana), que no se reflejan en ningún parámetro de la ecuación exponencial (Zimdahl<sup>40</sup> *et al.*, 1994).

Por otra parte, se observa asimismo, que conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica, la constante de degradación ( $k$ ) también aumenta, de modo que se puede apreciar que  $k_{C_{13}} > k_{C_{12}} > k_{C_{11}} > k_{C_{10}}$ . Esta observación se cumple en todos los tratamientos realizados (**Verano 2005, Otoño 2005, Invierno 2006, Primavera 2006, Riego Sucesivo 2006**). Estos resultados, están en concordancia con el postulado de Swisher<sup>41</sup> (1987): “Principio de la distancia”.

Los valores del tiempo de vida media para la degradación del *LAS* total están comprendidos entre 1.92 y 10.41 días en el suelo estudiado. Estos tiempos están en concordancia con los estudios realizados por otros autores que también indican una rápida biodegradación donde un 80% del *LAS* añadido (empleando concentraciones de 8.0, 22.0 y 62.0 mg·kg<sup>-1</sup> *LAS* total en suelo) fue degradado en un plazo de 2 semanas (Elsgaard<sup>42</sup>

---

<sup>38</sup> Gustafson D.I., Holden L.R., *Nonlinear pesticide dissipation in soil: a new model based on special variability*. Environ. Sci. Technol. 24; 1032-1038, 1990

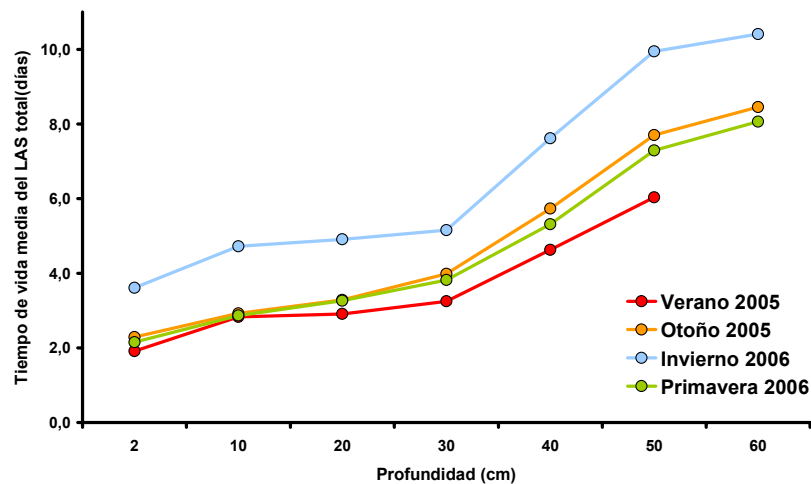
<sup>39</sup> Beulke S., Malkokmes H.-P., *Effects of the herbicides metazachlor and dinoterb on the soil microflora and the degradation and sorption of metazachlor under different environmental conditions*. Biol. Fertil. Soils 33; 467-471, 2001

<sup>40</sup> Zimdahl R., Cranmer B.K., Stroup W., *Use of empirical equations to describe dissipation of metribuzin and pendimethalin*. Weed Sci. 42; 241-248, 1994

<sup>41</sup> Swisher R.D., *Surfactants biodegradation*, 2º Ed. Marcell Dekker, New York, USA, 1987

<sup>42</sup> Elsgaard L., Petersen S.O., Deboz K., *Effect and risk assessment of linear alkylbenzene sulphonates in agricultural soil. 2. Effects on soil microbiology as influenced by sewage sludge and incubation time*. Environ. Toxicol. Chem. 20; 1664-1672, 2001

et al., 2001; Vinther<sup>43</sup> et al., 2003). Los datos experimentales encontrados están representados en la siguiente figura.



**Figura 5.68** - Tiempo de vida media para el LAS total a distintas profundidades

En la literatura científica se puede encontrar un amplio intervalo de tiempos de vida media para el LAS en ambientes terrestres (desde 1 hasta 87 días) como ha sido observado por Jensen<sup>44</sup> (1999), Cavalli & Valtorta<sup>45</sup> (1999), Scott & Jones<sup>46</sup> (2000). Este amplio intervalo puede atribuirse al conjunto de variables que pueden influir sobre este parámetro: tipo de suelo, formulación del LAS empleado, las condiciones relacionadas con los microorganismos (temperatura, contenido de agua) y el modo de exposición/aplicación del LAS (disolución acuosa o presente en lodo residual). La mayoría de los estudios donde se señala el período más largo de degradación del LAS es cuando éste es aplicado bajo la forma de lodo

<sup>43</sup> Vinther F.P., Mortensen G.K., Elsgaard L., *Effects of linear alkylbenzene sulphonates on functional diversity of microbial communities in soil*. Environ. Toxicol. Chem. 22; 35-39, 2003

<sup>44</sup> Jensen J., *Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment*. Sci. Total Environ. 226; 93-111, 1999

<sup>45</sup> Cavalli L., Valtorta L., *Surfactants in sludge-amended soil*. Tenside Surf. Det. 36; 22-28, 1999

<sup>46</sup> Scott M.J., Jones M.N., *The biodegradation of surfactants in the environment*. Biochim. Biophys. Acta 1508; 235-251, 2000

residual, lo que constituye según Scott & Jones<sup>46</sup> (2000) la principal fuente de aportación del LAS en ambientes terrestres.

En este estudio se ha demostrado que la degradación del LAS en suelo agrícola, aplicado en forma acuosa, es rápida. Estos resultados están en concordancia con otros resultados similares y con períodos cortos (3 - 7 días) que fueron publicados para la degradación de LAS en cuatro suelos alemanes con cantidades bajas de materia orgánica (Küchler & Schnaak<sup>47</sup>, 1997). Asimismo, Larson<sup>48</sup> *et al.* (1989) publicaron un tiempo de vida media para la degradación del LAS en distintos suelos que variaba desde 1 - 5 días. Gejlsbjerg<sup>49</sup> *et al.* (2001) divulgaron que el LAS biodisponible fue mineralizado a CO<sub>2</sub> con períodos de 7.9 días en el suelo. Holt & Bernstein<sup>50</sup> (1992), relataron un tiempo de vida media para el LAS en suelo de aproximadamente 8 días, con una eliminación del analito del 94 - 99%. Litz<sup>21</sup> *et al.* (1987) obtuvieron tiempos de entre 7 - 10 días.

Como se indicó anteriormente, la velocidad de degradación varió en función de las estaciones estudiadas, de forma que la campaña de **Verano 2005 > Primavera 2006 ≈ Otoño 2005 > Invierno 2006**. A modo ilustrativo, en la figura se representan los datos de *lnc* del LAS total frente al tiempo a 2 cm de profundidad para cuatro diferentes estaciones. En ella se puede apreciar que el valor de la pendiente (coincidente con -k) varía con la estación en la forma:  $\mathbf{b}_{\text{verano}} > \mathbf{b}_{\text{primavera}} \approx \mathbf{b}_{\text{otoño}} > \mathbf{b}_{\text{invierno}}$ .

<sup>47</sup> Küchler T., Schnaak W., *Behaviour of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in sandy soils with low amounts of organic matter*. Chemosphere 35; 153-167, 1997

<sup>48</sup> Larson R.J., Federle T.W., Shimp R.J., Ventullo R.M., *Behaviour of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater*. Tenside. Surf. Deterg. 26; 116-121, 1989

<sup>49</sup> Gejlsbjerg B., Klinge C., Madsen T., *Mineralization of organic contaminants in sludge-soil mixtures*. Environ. Toxicol. Chem. 20; 698-705, 2001

<sup>50</sup> Holt M.S., Bernstein S.L., *Linear alkylbenzenes in sewage sludges and sludge-amended soils*. Water Res. 26; 613-624, 1992



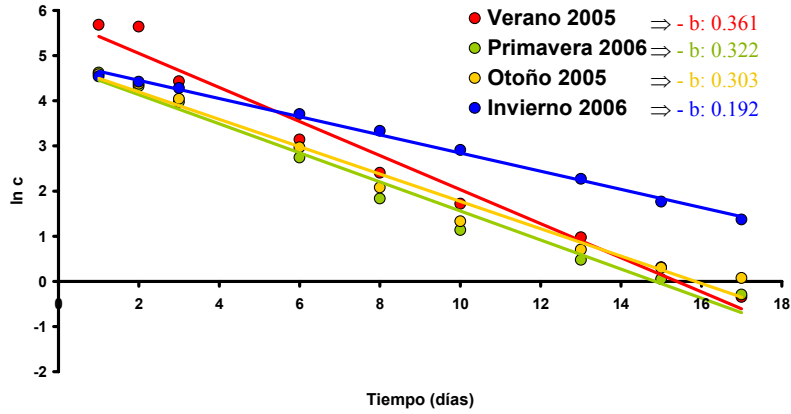
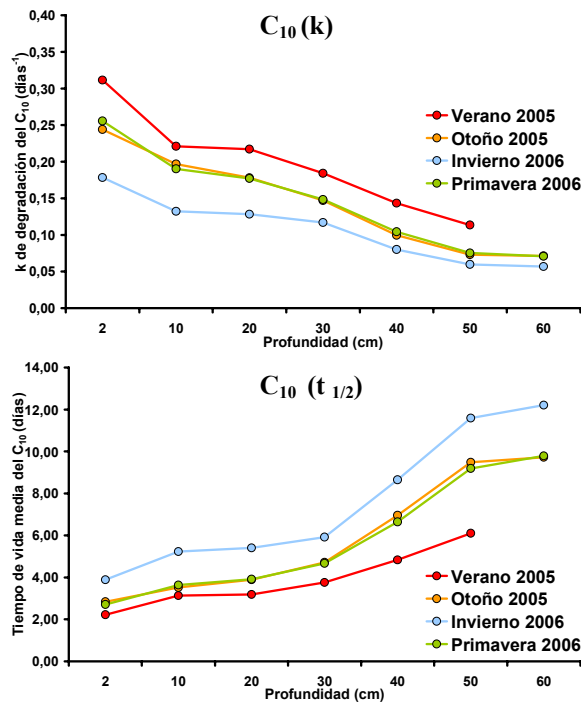
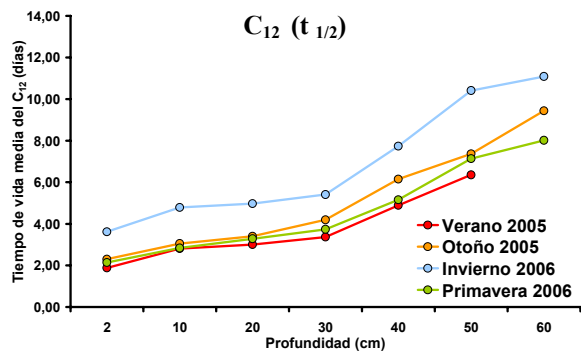
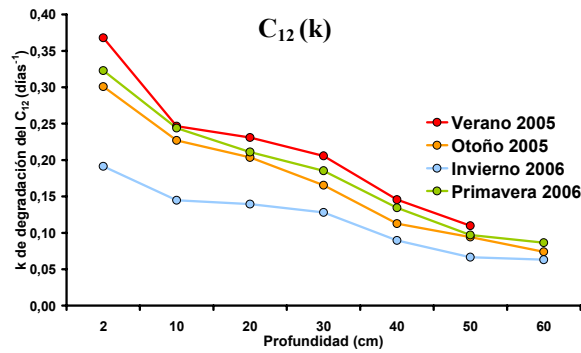
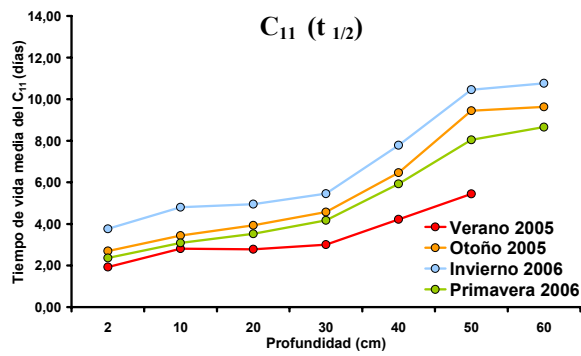
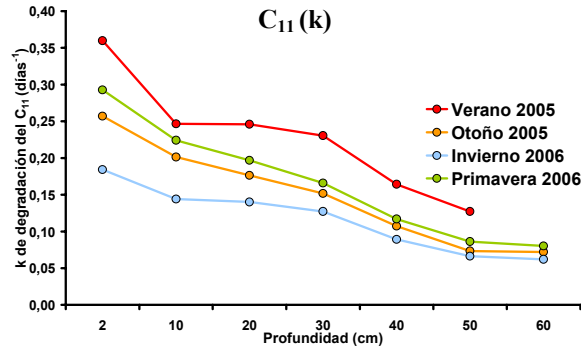


Figura 5.69 - Degradación del LAS total en la zona superficial en las estaciones estudiadas

Estas mismas conclusiones se deducen de las siguientes figuras, donde se representan los valores de  $k$  y  $t_{1/2}$  encontrados para cada homólogo en las diferentes estaciones en función de la profundidad.





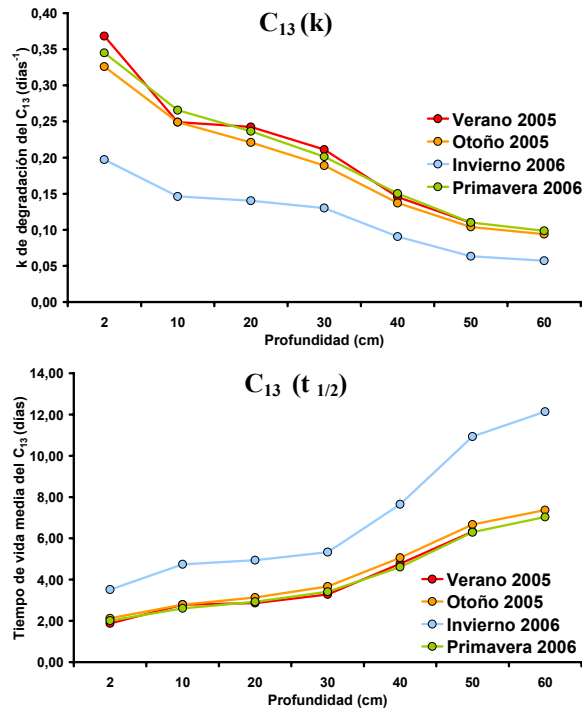


Figura 5.70 - Valores de  $k$  y  $t_{1/2}$  obtenidos para los homólogos del LAS

La diferencia encontrada entre estos parámetros según la estación considerada puede atribuirse a la influencia de una de las variables climatológicas medidas: la temperatura.

En la siguiente figura se han representado los valores medios de temperatura encontrados en las diferentes campañas realizadas, observando como es bien sabido, que al incrementarla, aumenta la velocidad de degradación. Asimismo, como se expondrá más adelante, la temperatura también afecta a la población bacteriana del suelo que, a su vez, incide directamente sobre la velocidad de degradación del LAS.

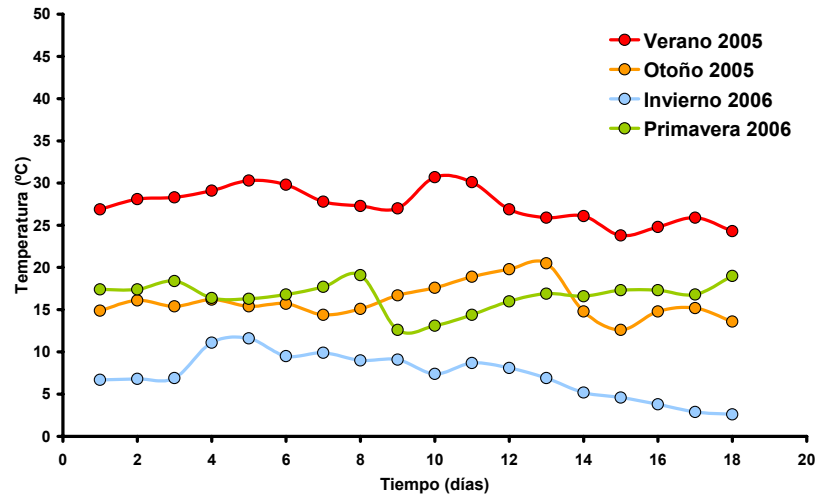


Figura 5.71 - Temperatura media en las diferentes estaciones

Comparando los tratamientos convencionales con el de riegos sucesivos se puede observar que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), al aumentar la frecuencia de riego, se hace próximo a la unidad (100%) a profundidades superiores a 30 cm. Esta mejora del ajuste de los datos experimentales al modelo cinético de primer orden podría explicarse por el gran aporte de agua, que en la campaña de verano, debido a las altas tasas de evaporación, fue insuficiente, efecto también observable en las campañas de otoño y primavera a profundidades de 50 y 60 cm. En el tratamiento con riegos sucesivos se advierte una disminución de  $R^2$  en las capas más superficiales (2, 10 y 20 cm), donde hay un mayor desajuste al modelo, debido a una lixiviación inducida por el elevado incremento de agua.

Estos resultados pueden ser observados en la siguiente figura.

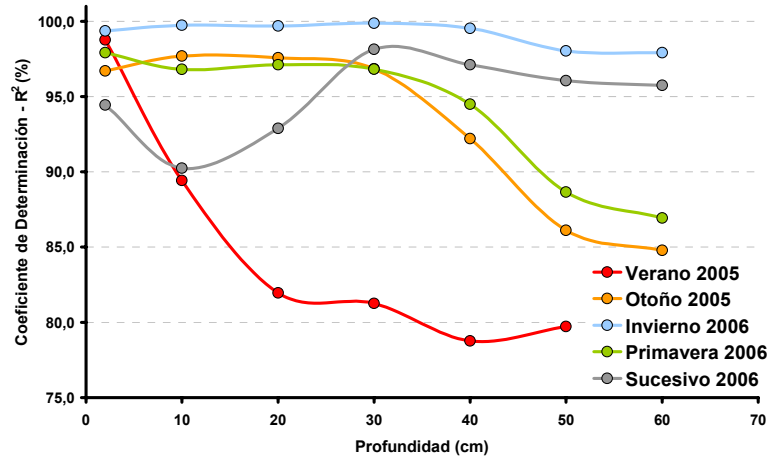


Figura 5.72 - Coeficientes de determinación ( $R^2$ )

Asimismo, en la **Figura 5.73**, se puede constatar que en el tratamiento de riegos sucesivos, la constante de degradación ( $k$ ) a partir de una determinada profundidad (20 cm) prácticamente se mantiene con un valor constante. Esto puede ser debido a que, con el empleo de más riegos, se fuerza la lixiviación del LAS y los micronutrientes, homogeneizando la zona comprendida entre los 20 y 60 cm.

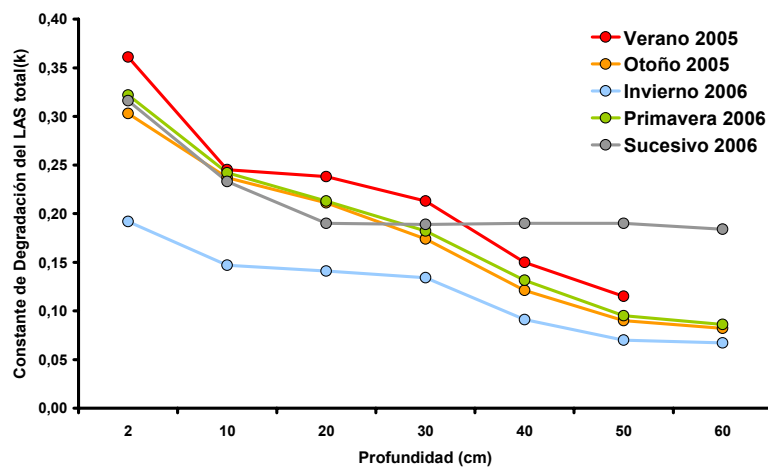


Figura 5.73 - Constantes de degradación del LAS total a diferentes profundidades

En relación con todo lo expuesto se puede comprobar que el tiempo de desaparición del LAS, cuando sometido a riegos sucesivos, se reduce significativamente. De forma ilustrativa, en la siguiente figura se puede comprobar que la tasa de desaparición del LAS con riegos sucesivos, comparándolo con la **Primavera 2006**, puede ser cerca de tres veces menor.

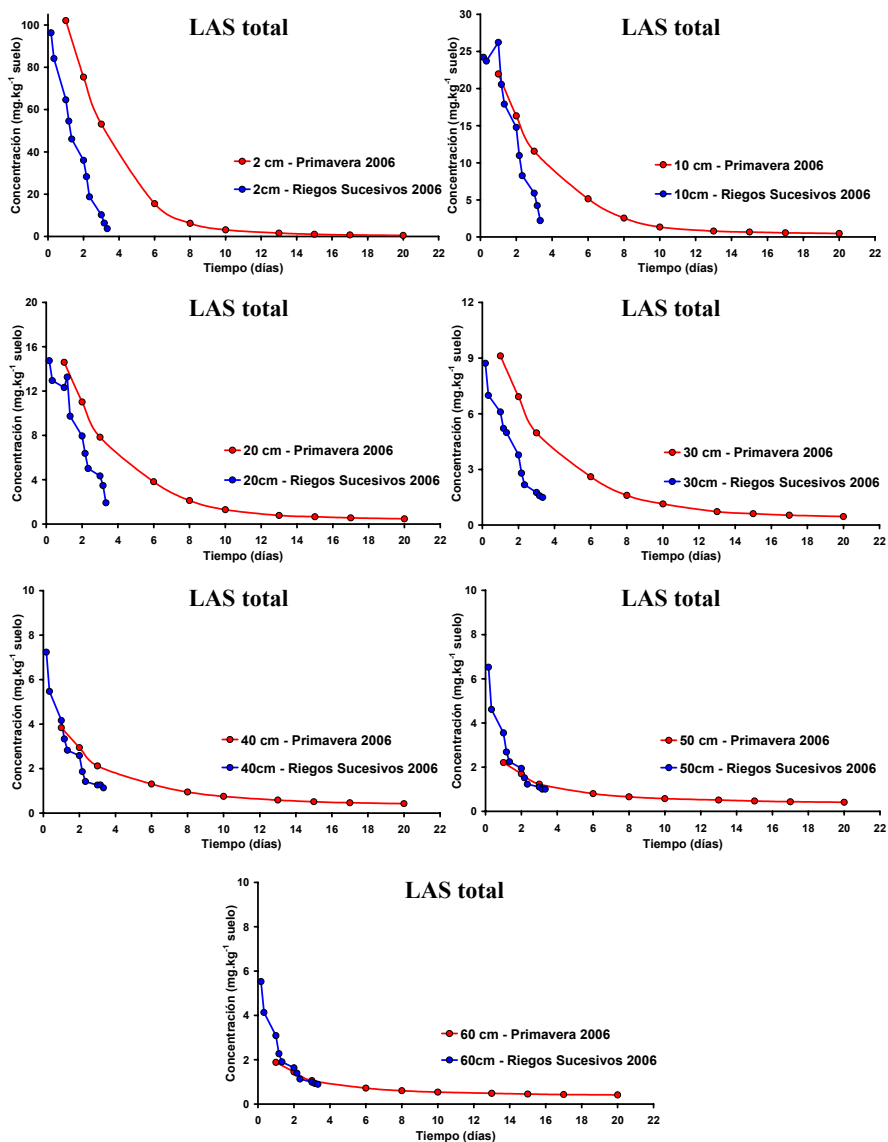


Figura 5.74 - Comparación entre los tratamientos de Riegos Sucesivos y Primavera 2006

### 4.3.3 - Evaluación de la microbiota del suelo

En el suelo, por lo general, hay una gran variedad de microorganismos que son capaces de degradar una amplia diversidad de compuestos, desde los más simples como los polisacáridos, aminoácidos, proteínas, lípidos, etc., a los más complejos como los residuos de plantas, aceites o ceras.

La degradación microbiológica o biodegradación es la principal forma de degradación del LAS en el suelo, sobre todo en condiciones aeróbicas, ya que el LAS no sufre una significativa degradación por mecanismos abióticos bajo condiciones ambientales pues en su estructura química carece de grupos fotolizables o hidrolizables (OECD - SIDS<sup>51</sup>, 2005). La biodegradación dependerá, por lo tanto, de las características del suelo como las del compuesto químico. En el suelo, el número de individuos, los tipos (la biodiversidad) y el metabolismo de los microorganismos presentes e involucrados en este proceso (biodegradación) dependen de diversos factores ambientales como pueden ser los nutrientes, la humedad, la aireación, la temperatura, el pH, las prácticas agrícolas aplicadas al suelo (Wardle<sup>52</sup>, 1992; Jenkinson<sup>53</sup>, 1992), etc.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y metabolismo bacteriano es complejo. Por un lado cada reacción química individual, de todas las que conforman el metabolismo, es afectada por la temperatura, por lo que un incremento de ésta resulta en una mayor velocidad de reacción. Por otra parte, aumentos posteriores de temperatura inactivan las enzimas que

---

<sup>51</sup> OECD - SIDS. LAS. SIDS Initial Assessment Report for 20<sup>th</sup> SIAM. Paris, France, p. 4, 2005

<sup>52</sup> Wardle D.A., *A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil*. Biol. Rev. 67; 321-358, 1992

<sup>53</sup> Jenkinson D.S., *La materia orgánica del suelo: evolución*. En: Wild, A: Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, 1992

catalizan las reacciones, con lo que el valor de la población bacteriana decrece rápidamente. La temperatura óptima resulta de la interacción de estos dos efectos. Como ejemplo de la actividad bacteriana se puede citar la respiración de los microorganismos en el suelo (Gresi<sup>54</sup>, 1992). La respiración del suelo es un proceso que se pone de manifiesto a través del desprendimiento de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub> resultante del metabolismo de los organismos vivos existentes en el suelo. En la siguiente figura se puede observar el efecto de la temperatura en la actividad bacteriana, donde se constata que un aumento de 10 °C en la temperatura incrementa la velocidad de reacción de las enzimas en 2 veces.

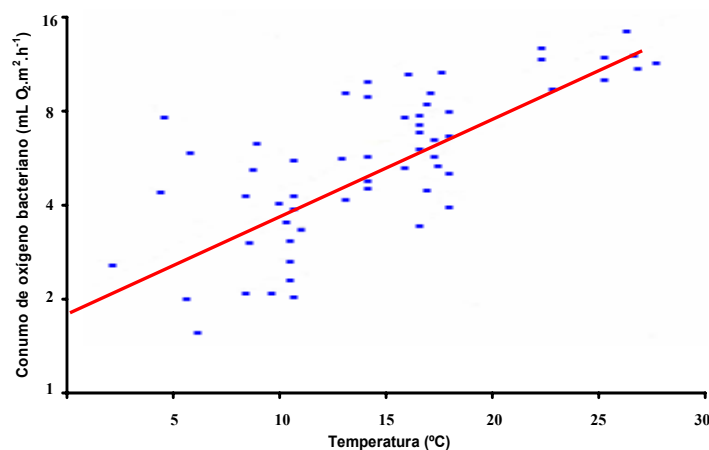


Figura 5.75 - Efecto de la temperatura<sup>55</sup> en el metabolismo bacteriano

En la presente Memoria, al establecer una correlación entre el metabolismo bacteriano, representado por los parámetros de biodegradación encontrados, con la temperatura, los resultados encontrados fueron los que se muestran en la siguiente figura.

<sup>54</sup> Gresi B.M., *Biomassa microbiana do solo: métodos de determinação e resultados recentes*. En: Simposio de Microbiologia do solo. São Paulo, Brasil, 1992

<sup>55</sup> Peterjohn W.T., Melillo J.M., Hernández T., García C., *Effect of long-term monoculture on microbiological and biochemical properties in semiarid soils*. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 32; 537-552, 1994



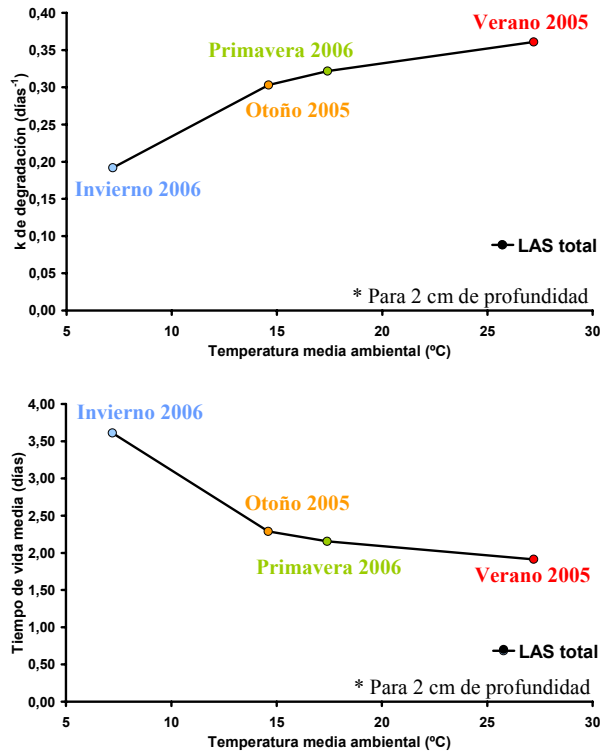
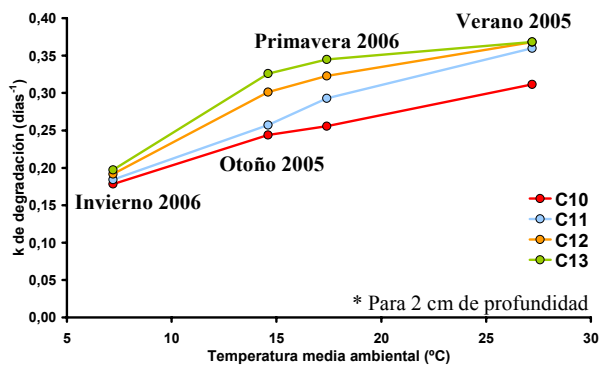


Figura 5.76 - Relación entre la degradación y la temperatura

En cuanto a los homólogos del LAS, el comportamiento es muy similar, **Figura 5.77**, observándose una degradación mayor conforme aumenta la temperatura y la longitud de la cadena alquímica.



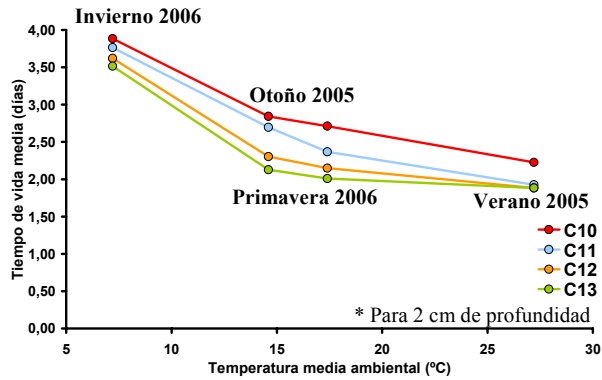


Figura 5.77 - Relación entre las velocidades de degradación de los homólogos en la capa superficial y la temperatura

El efecto directo de la temperatura también se puede observar sobre la cantidad de microorganismos. De hecho, las bacterias incluso pueden ser clasificadas en función del intervalo de temperatura óptimo para su desarrollo, crecimiento y reproducción, como se verifica en la **Figura 5.78**.

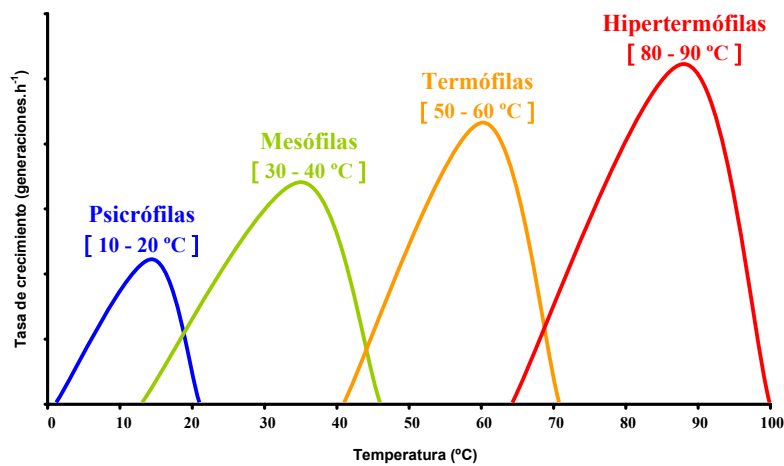
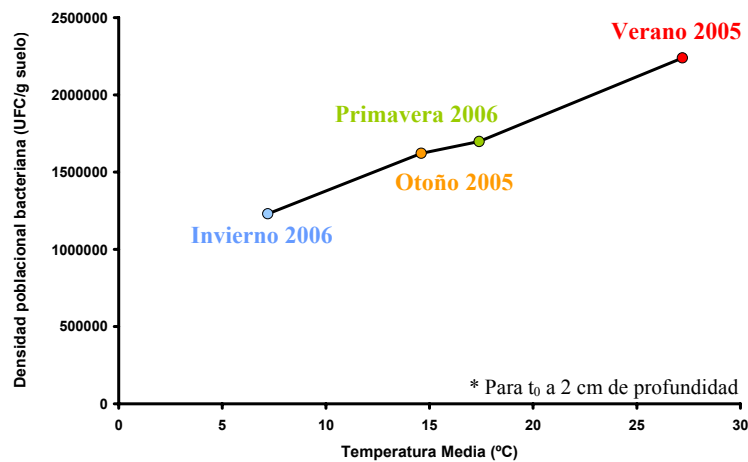


Figura 5.78 - Efecto de la temperatura en el crecimiento de la población bacteriana

En el suelo, la gran mayoría de las comunidades microbiológicas presentes pertenecen a la clase mesófila. Según Tate<sup>56</sup> (1995), la tasa de crecimiento aumenta hasta que se alcanza una temperatura óptima, dependiendo de la clase de bacteria en cuestión, obedeciendo la *ley de tolerancia* (intervalo por lo cual los microorganismos se desarrollan, respetando los límites de tolerancia a la temperatura). Por otro lado, Biederbeck & Campbell<sup>57</sup>, 1971, concluyen que la reducción de la temperatura resulta en un significativo descenso en la población bacteriana.

En la presente Memoria, al establecer una correlación entre la densidad poblacional bacteriana con la temperatura, los resultados encontrados fueron los que se muestran en la siguiente figura.



**Figura 5.79** - Relación entre la temperatura y la densidad poblacional bacteriana

Según los resultados obtenidos, se nota cierto cambio en la densidad poblacional

<sup>56</sup> Tate R.L., *Soil microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1995

<sup>57</sup> Biederbeck V.A., Campbell C.A., *Influence of simulated Fall and Spring conditions on the soil system. I. Effect on soil microflora*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35; 474-479, 1971

bacteriana del suelo en las distintas estaciones del año resultando mayor en el **verano** > **primavera**  $\approx$  **otoño** > **invierno**. Estos resultados están en concordancia con los descritos en la literatura científica que afirman que las medidas de densidad microbiana suelen presentar un elevado grado de estacionalidad, generalmente caracterizada por máximos valores en verano y mínimos en invierno (Patra<sup>58</sup> *et al.*, 1990; Bardgett<sup>59</sup> *et al.*, 1999). Otro estudio, al relacionar la actividad microbiana con la temperatura, muestra que el crecimiento en la actividad es nulo a 0 °C, y que a partir de los 10 °C de temperatura la actividad microbiana se incrementa hasta alcanzar un máximo entre los 25 - 35 °C, donde se encuentra el óptimo de temperatura para el crecimiento de la mayoría de microorganismos (Paul & Clarck<sup>60</sup>, 1989). Específicamente en el suelo, la dinámica microbiológica se ve fuertemente frenada cuando la temperatura baja de 10 °C, como ocurrió en el tratamiento de invierno, afectando a casi todos los procesos microbianos, excepto la amonificación y la denitrificación.

El recuento de microorganismos resulta útil, sobre todo, cuando se establece una comparación entre condiciones experimentales similares para verificar un determinado efecto, como puede ser el comportamiento de los microorganismos frente a la exposición al *LAS*. Con esta finalidad, en la **Figura 5.80**, se puede apreciar la conducta presentada por la microbiota en el suelo durante todas las distintas campañas realizadas, relacionando la densidad bacteriana con el tiempo, junto con los datos de las correspondientes temperaturas ambientales.

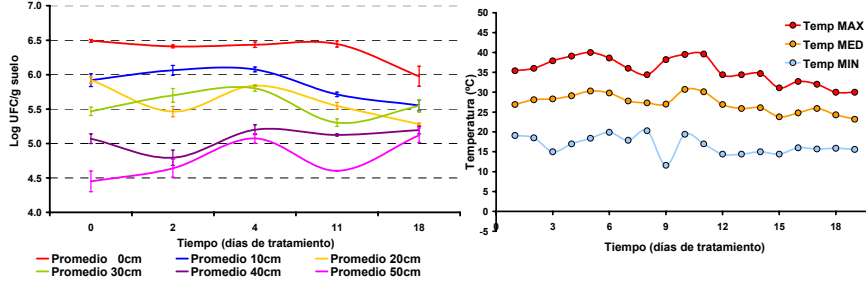
---

<sup>58</sup> Patra D.D., Brookes P.C., Coleman K., Jenkinson D.S., *Seasonal changes of soil microbial biomass in an arable and grassland soil which have been under uniform management for many years*. Soil Biol. Biochem. 22; 739-742, 1990

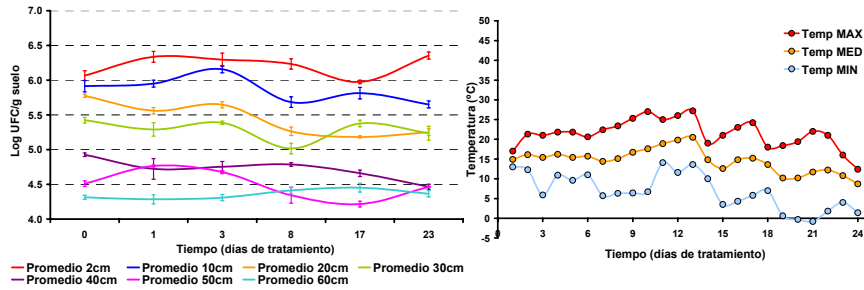
<sup>59</sup> Bardgett R.D., Novell R.D., Hobbs P.J., Jarvis S.C., *Seasonal changes in soil microbial communities along a fertility gradient of temperate grassland*. Soil Biol. Biochem. 31; 1021-1030, 1999

<sup>60</sup> Paul E.A., Clarck F.E., *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press Inc., San Diego, USA, p. 273, 1989

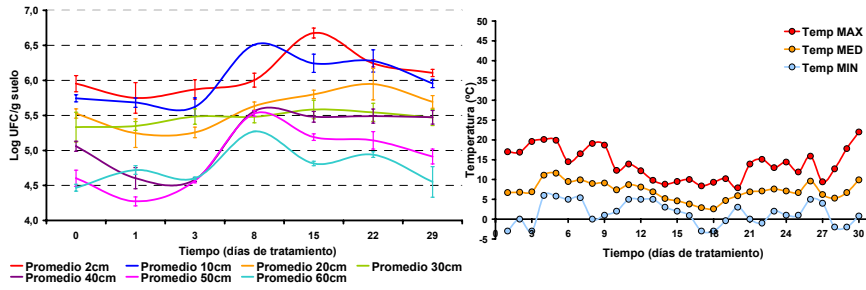
**Tratamiento de Verano 2005**



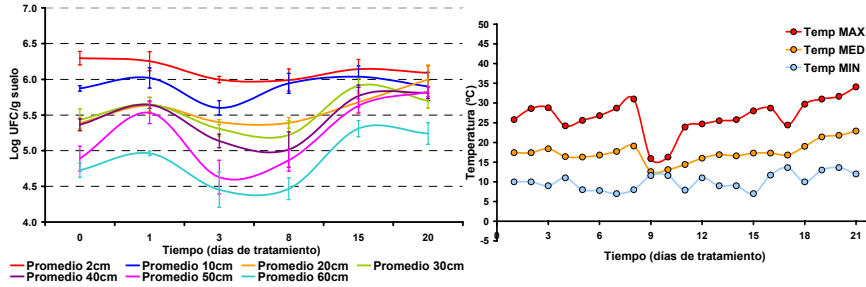
**Tratamiento de Otoño 2005**



**Tratamiento de Invierno 2006**



**Tratamiento de Primavera 2006**



**Figura 5.80 - Comportamiento de la microbiota en las distintas estaciones**

Se puede afirmar que no hubo cambios significativos en las poblaciones cuando se aplicó el *LAS* en la parcela agrícola. Por lo general, la densidad bacteriana se mantuvo prácticamente inalterada, no habiendo un enaltecido crecimiento bacteriano pero tampoco una acentuada muerte celular. La comparación de los análisis microbiológicos del suelo antes y después de las diferentes aplicaciones de *LAS* permiten afirmar que no hubo cambios significativos en la población bacteriana por lo que se descarta todo tipo de acción germicida a las concentraciones ensayadas en la parcela agrícola.

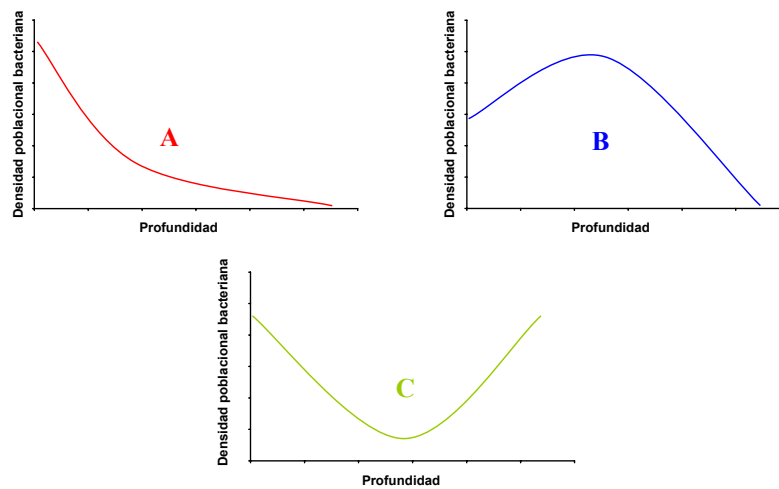
El recuento también puede resultar útil cuando se trata de establecer la distribución (en profundidades) de la microbiota en el suelo ya que los microorganismos no están distribuidos regularmente en el suelo pues ciertamente hay un mosaico discontinuo de microambientes. La dispersión de los microorganismos, con excepción de los fotosintetizantes, sigue la distribución vertical de los nutrientes pero es alterada por varios factores: la composición de la atmósfera del suelo, el pH, la humedad, la cantidad de minerales asimilables, la presencia de sustancias antimicrobianas<sup>61</sup>.

En la **Figura 5.81** se puede apreciar los principales tipos de distribución de las bacterias en suelo. En la curva más frecuente (**A**), de tipo decreciente, la densidad microbiana alcanza un máximo muy cerca de la superficie y disminuye progresivamente con la profundidad. La reducción en los primeros centímetros de suelo se debe a la luz solar y la desecación. En la curva de tipo convexo (**B**), la densidad microbiana aumenta en un horizonte intermedio, por ejemplo en el caso de ciertos suelos forestales, donde el mantillo puede aportar sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano y que no son biodegradadas rápidamente en el horizonte superior. La curva de tipo cóncavo (**C**) muestra que la densidad microbiana en el horizonte intermedio

---

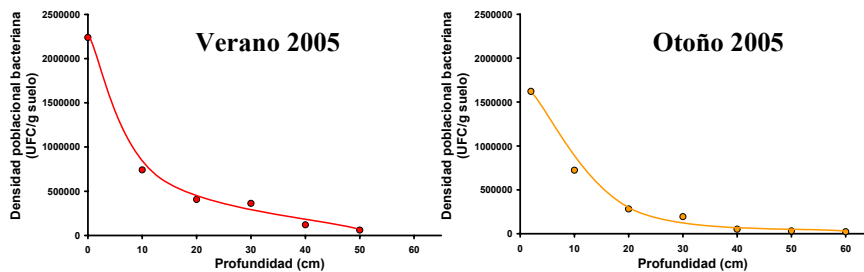
<sup>61</sup> Dommergues Y., Manganot F., *Écologie microbienne du sol*. Masson et Cie, Paris, France, pp 92-154, 1970

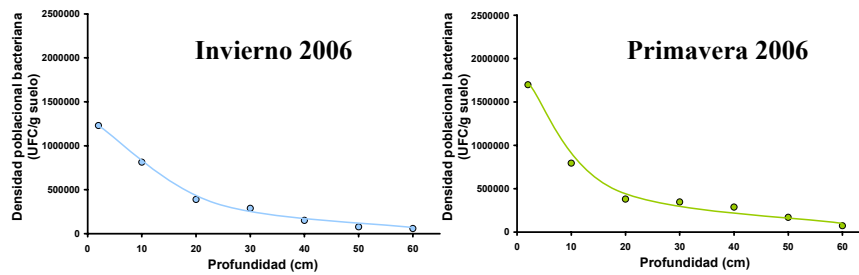
es menor que en la superficie y la profundidad, ocurriendo cuando se acumulan compuestos inhibitorios, vegetales o producidos por microorganismos, mientras que la estimulación de la profundidad suele deberse a un aumento del pH por la proximidad del material calcáreo de base<sup>61</sup>.



**Figura 5.81** - Distintas distribuciones de bacterias en el suelo

Del análisis de los resultados obtenidos a lo largo de todas las campañas realizadas, se puede afirmar que en el suelo de la Vega de Granada, las bacterias se distribuyen según una curva del tipo **A**, como se puede apreciar en la **Figura 5.82**.





**Figura 5.82** - Distribución de la densidad bacteriana en función de la profundidad. Datos tomados en el tiempo cero

De esta forma se puede apreciar que la densidad microbiana es superior en la zona superficial puesto que allí concurren las condiciones óptimas (temperatura, agua, nutrientes,  $O_2$  disuelto, luz) para su desarrollo. A medida que aumenta la profundidad, se limitan algún(os) condicionante(s) para su desarrollo lo que ocasiona un descenso del número de individuos. Este hecho podría justificar la disminución observada en las velocidades de desaparición del *LAS* al incrementar la profundidad.

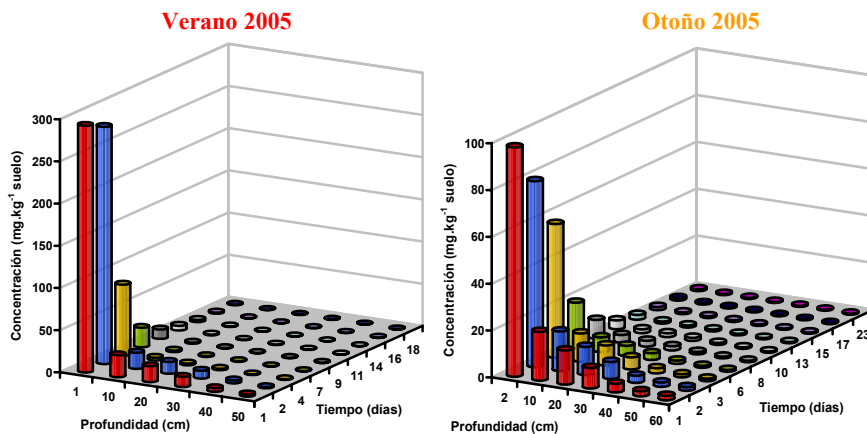
#### 4.3.4 - Consideraciones finales

Como se ha expuesto anteriormente, las constantes de degradación ( $k$ ) obtenidas para el *LAS* total en el procesamiento de los datos experimentales en cada tratamiento estacional, pone de manifiesto que  $k_{\text{verano}} > k_{\text{primavera}} \approx k_{\text{otoño}} > k_{\text{invierno}}$ , existiendo una tendencia equivalente para cada uno de los correspondientes homólogos. Estos resultados si además se consideran los datos microbiológicos y medioambientales, ratifican que la desaparición de este compuesto está favorecida por la temperatura ya que ésta actúa directamente sobre el metabolismo de los principales agentes que degradan el *LAS* en estas condiciones. Esta observación está en consonancia con otros trabajos científicos, tales como



el realizado por Sales<sup>62</sup> *et al.*, 1987, que relaciona la actividad bacteriana con la temperatura en el proceso de biodegradación del LAS; Terzic<sup>63</sup> *et al.*, 1992, que además de la temperatura considera otros factores como el tipo bacteriano y la estructura del grupo alquilbenzeno; Van Ginkel<sup>64</sup> *et al.*, 1996, concluye que la biodegradación es realizada por un consorcio de microorganismos (debido a la limitada capacidad metabólica de éstos, individualmente); Jiménez<sup>65</sup> *et al.*, 1991, que especifica que este consorcio es capaz de degradar por completo el LAS, estando constituido por cuatro tipos de bacterias, de los cuales tres se encargarían de promover la oxidación de la cadena alquímica y un sinergismo entre todos, promovería la mineralización del anillo aromático.

En la siguiente figura se muestran de forma esquemática, los resultados obtenidos en los tratamientos realizados, representándose la concentración de LAS, tiempo y profundidad para las distintas estaciones.



<sup>62</sup> Sales D., Quiroga J.M., Gómez-Parra A., *Primary degradation kinetics of anionic surfactants in marine environment*. Bull. Environ. Contam. 39, 385-392, 1987

<sup>63</sup> Terzic S., Hrsax D., Ahel M., *Primary biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in estuarine waters*. Water Res. 26; 585-591, 1992

<sup>64</sup> Van Ginkel G.C., *Complete degradation of xenobiotics surfactants by consortium of aerobic microorganisms*. Bioedegradation 7; 151-164, 1996

<sup>65</sup> Jimenez L., Breen A., Thomas N., Federle T.W., Sayler G.S., *Mineralization of LAS by a four member bacterial consortium*. Appl. Environ. Microbiol. 57; 1566-1569, 1991

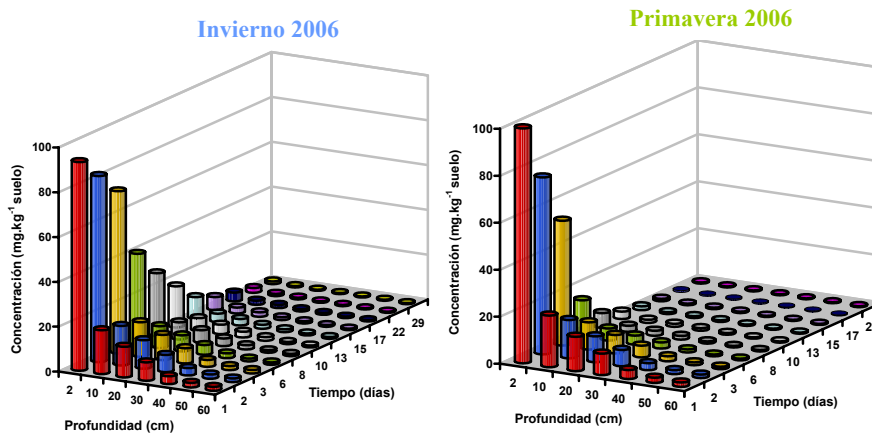


Figura 5.83 - Comportamiento del LAS total en los distintos tratamientos

Los datos de concentración de LAS total a cada profundidad se han expresado en modo porcentual y se han representado en las Figuras 5.84 a 5.88. En ellas se observa con claridad, que el analito se retiene en gran medida, en las capas superficiales (hasta los 20 cm), donde se cuantifica alrededor de un 70% de la cantidad total determinada en la primera toma de muestra. Esta situación se produce en todas las campañas.

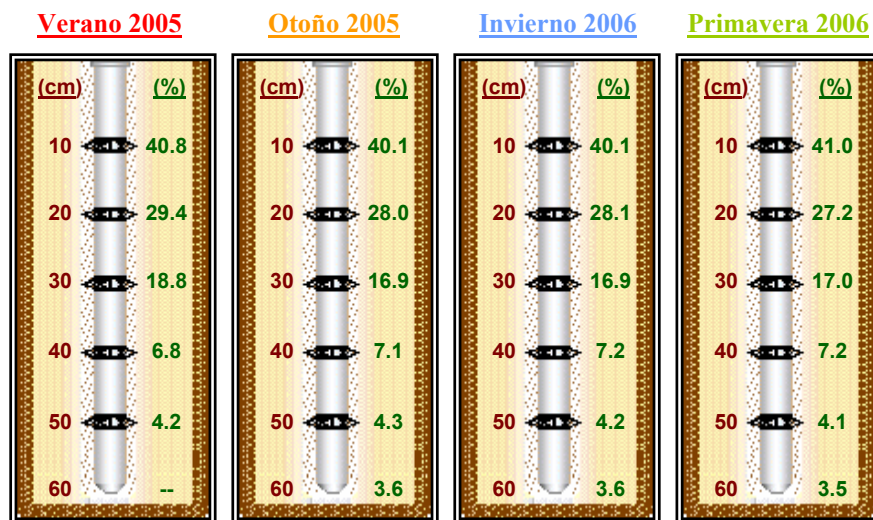


Figura 5.84 - Distribución del LAS total en la primera toma de muestra en todas estaciones

En las siguientes figuras se representa esquemáticamente la distribución de LAS total en todos los tratamientos realizados para cada campaña a las diferentes profundidades, en función del tiempo.

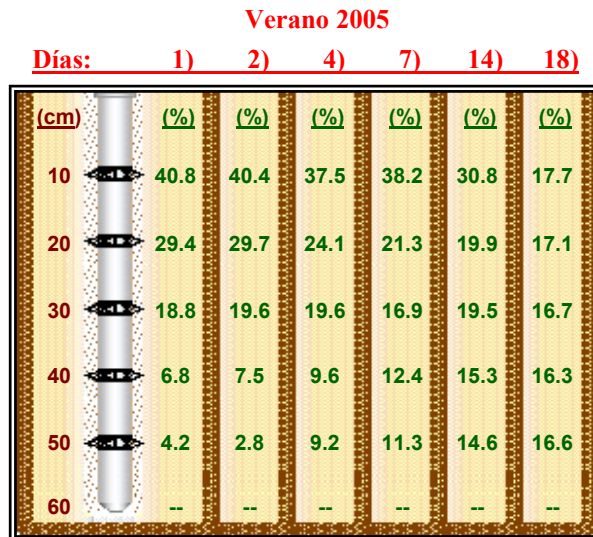


Figura 5.85 - Distribución del LAS total en el tratamiento de Verano 2005

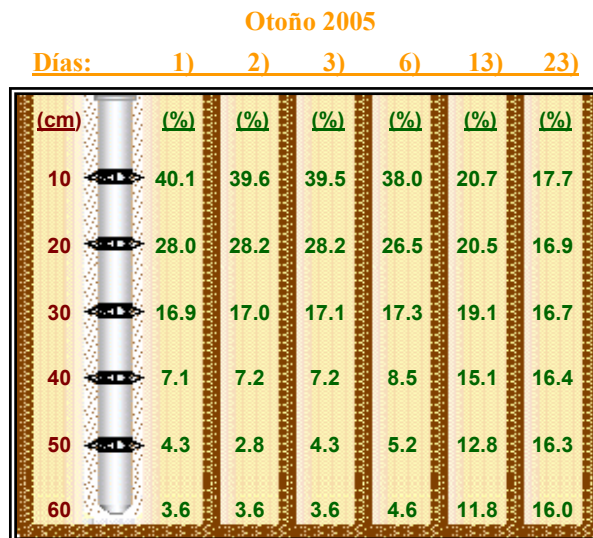
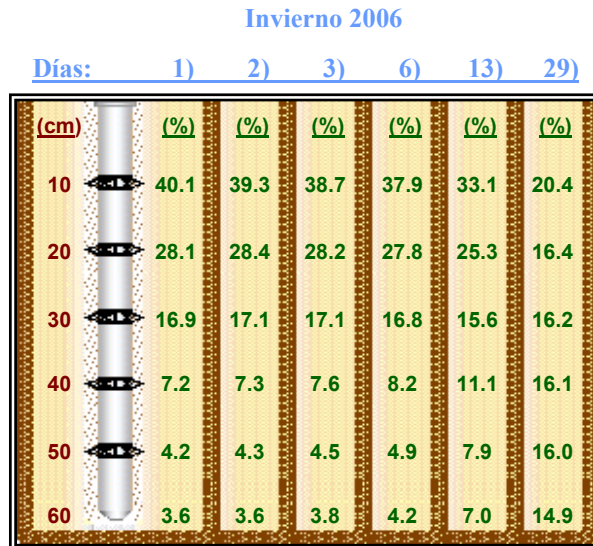
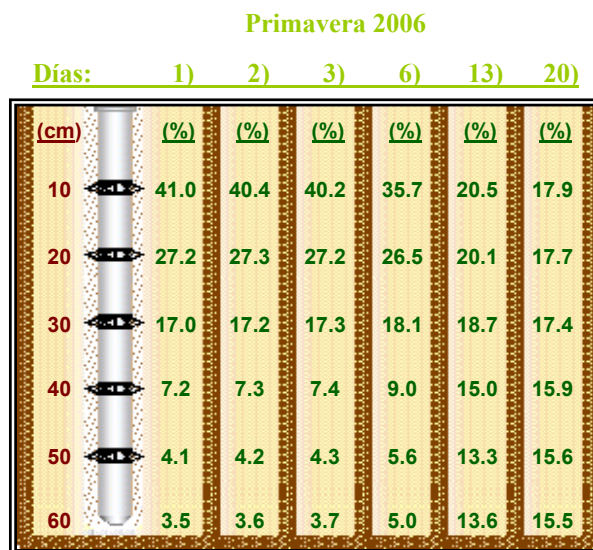


Figura 5.86 - Distribución del LAS total en el tratamiento de Otoño 2005



*Figura 5.87 - Distribución del LAS total en el tratamiento de Invierno 2006*

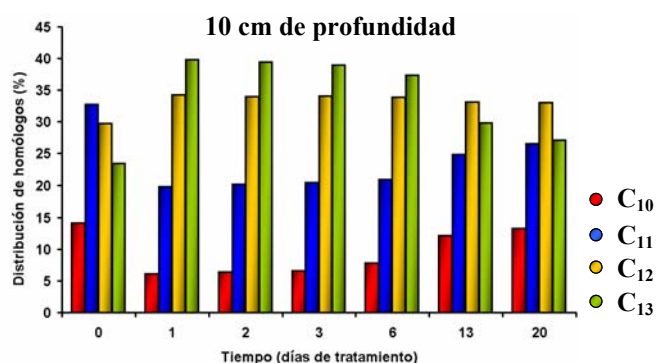


*Figura 5.88 - Distribución del LAS total en el tratamiento de Primavera 2006*

Este hecho observado de una mayor retención del LAS en las capas

superficiales, está en conformidad con otros trabajos científicos realizados, como: Litz<sup>21</sup> *et al.*, 1987; Figge & Schöberl<sup>66</sup>, 1989. Este fenómeno, juntamente con la biodegradación de sus componentes, considerada rápida, son los factores que determinan que este analito no alcance profundidades significativas y, consecuentemente, no se produzca la contaminación de los acuíferos o aguas subterráneas (Thurman<sup>67</sup> *et al.*, 1986; Federle<sup>68</sup> *et al.*, 1990, McAvoy<sup>17</sup> *et al.*, 1994).

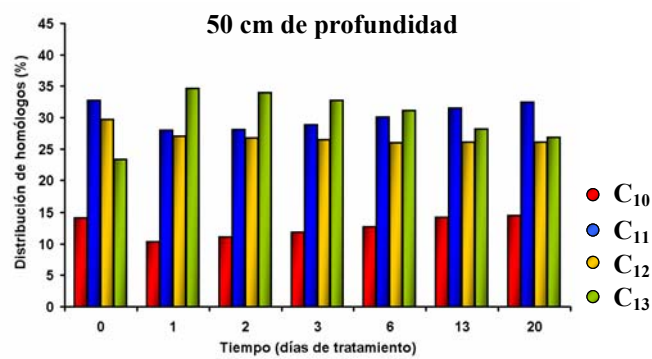
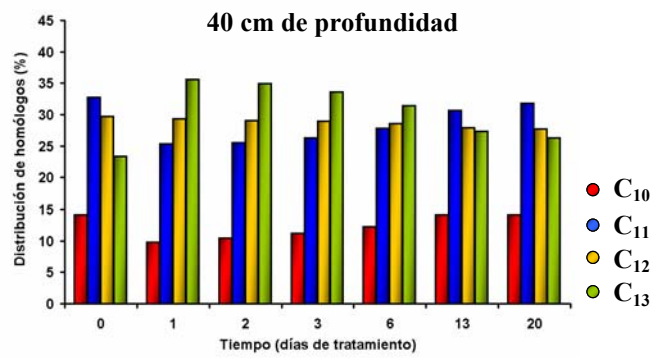
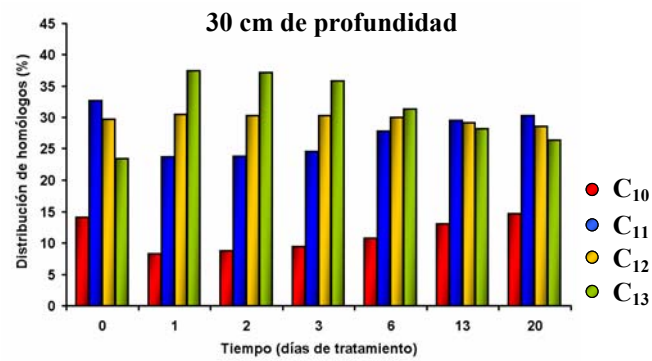
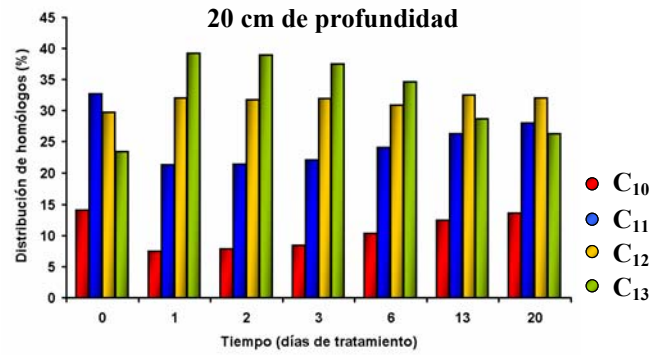
También se puede evaluar el cambio porcentual que experimentan los diferentes homólogos en su distribución en el suelo, comparados con la composición que presenta el producto comercial aplicado. Con esta finalidad, en la siguiente figura se muestra la evolución de la composición centesimal de los homólogos durante el tratamiento de la **Primavera 2006** en las profundidades de 10 hasta 60 cm.

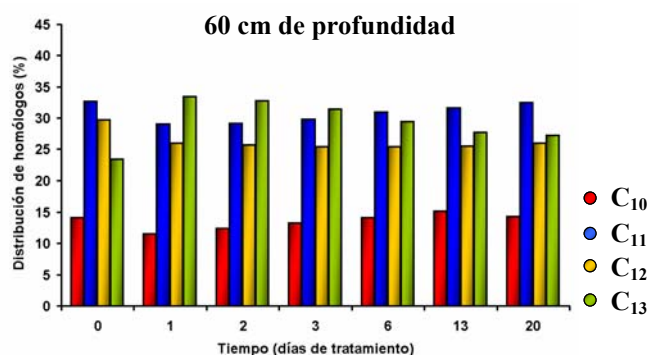


<sup>66</sup> Figge K., Schöberl P., *LAS and the application of sewage sludge in agriculture*. Tenside Surf. Det. 26; 122-128, 1989

<sup>67</sup> McAvoy D.C., White C.E., Moore B.L., Rapaport R.A., *Chemical fate and transport in a domestic septic system: sorption and transport of anionic and cationic surfactants*. Environ. Toxicol. Chem. 13; 213-221, 1994

<sup>68</sup> Federle T.W., Ventullo R.M., White D.C., *Spacial-distribution of microbial biomass, activity, community structure, and the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and linear alcohol ethoxylate (LAE) in the subsurface*. Microbial Ecol. 20; 297-313, 1990





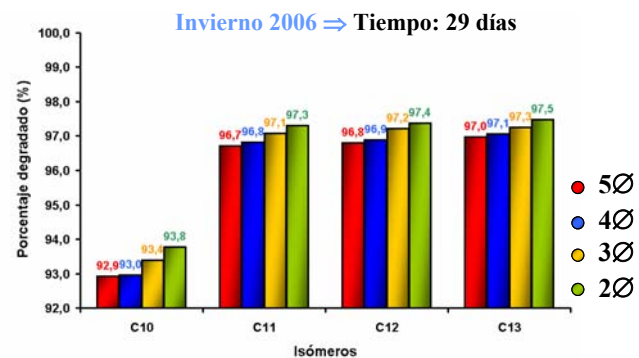
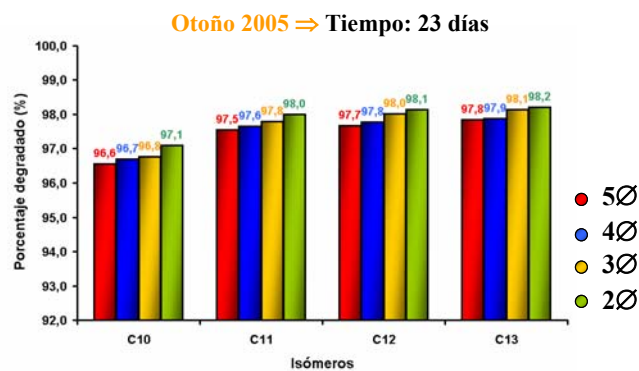
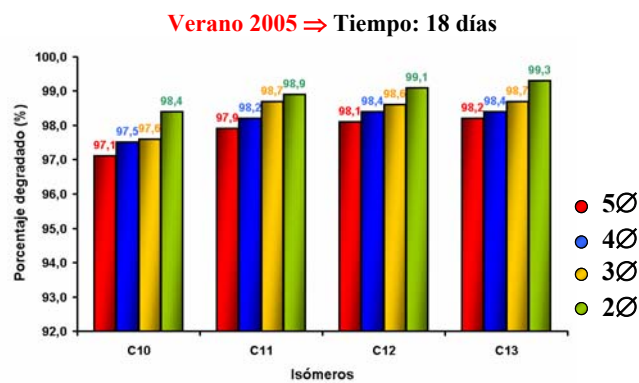
**Figura 5.89** - Cambio de distribución de los homólogos del LAS durante la Primavera 2006

En base a estas figuras, se puede observar que la proporción en la distribución de los homólogos se altera tras la aplicación realizada, manifestándose incluso en la primera colecta. Analizando a 10 cm de profundidad, hay una reducción porcentual de los homólogos de cadena alquílica más corta (C<sub>10</sub> y C<sub>11</sub>) y un aumento de los de cadena alquílica más larga (C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>) en relación al LAS comercial. Los cambios observados a todas las profundidades y en los diferentes tiempos pueden atribuirse a la conjunción de dos procesos, por una parte, los homólogos de cadena alquílica más corta se retienen menos que los de cadena más larga y por otra la diferente velocidad de degradación de cada homólogo en esas condiciones.

Analizando la distribución de los homólogos durante todo el tratamiento, se observa que se va incrementando la proporción relativa del C<sub>10</sub> y C<sub>11</sub>, a partir del segundo día de la aplicación, reduciéndose la de C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub>. Estas variaciones pueden atribuirse al hecho de que las constantes de degradación aumentan con la longitud de la cadena alquílica.



Se ha realizado asimismo este análisis a nivel de los isómeros, comparando los tratamientos a la profundidad de 10 cm. La degradación de cada componente se ha calculado a partir de las cantidades inicial y final encontradas expresando los resultados en porcentaje. En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos.





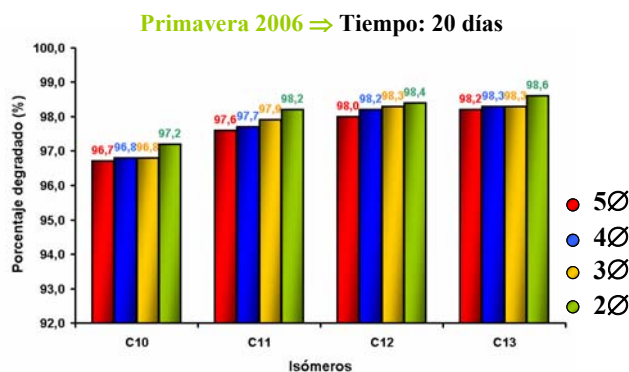


Figura 5.90 - Evaluación de la degradación de los isómeros del LAS

Se ha determinado también la constante de degradación ( $k$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) para cada isómero en todos los tratamientos realizados y en los primeros 20 cm de profundidad que es la zona donde este fenómeno ocurre con mayor intensidad. Los resultados están representados en las **Tablas 5.40 - 5.42**.

Tabla 5.40 - Parámetros  $k$  y  $t_{1/2}$  para los isómeros a 2 cm de profundidad

Verano 2005								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.311	0.311	0.312	0.313	0.359	0.360	0.360	0.362
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.230	2.226	2.222	2.214	1.930	1.926	1.923	1.915
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.367	0.368	0.369	0.370	0.369	0.369	0.370	0.371
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	1.888	1.884	1.880	1.873	1.880	1.877	1.873	1.866
Otoño 2005								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.241	0.244	0.246	0.253	0.253	0.256	0.260	0.267
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	2.875	2.840	2.822	2.738	2.738	2.706	2.662	2.591

Tabla 5.40 - Continuación

Otoño 2005								
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.296	0.300	0.309	0.314	0.323	0.324	0.336	0.339
t <sub>1/2</sub> (días)	2.339	2.308	2.243	2.205	2.145	2.137	2.062	2.046
Invierno 2006								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.176	0.176	0.181	0.185	0.181	0.182	0.187	0.191
t <sub>1/2</sub> (días)	3.939	3.930	3.837	3.756	3.836	3.802	3.708	3.625
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.188	0.189	0.195	0.199	0.194	0.196	0.199	0.204
t <sub>1/2</sub> (días)	3.693	3.663	3.549	3.491	3.576	3.545	3.470	3.402
Primavera 2006								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.253	0.256	0.257	0.265	0.288	0.292	0.296	0.304
t <sub>1/2</sub> (días)	2.742	2.709	2.632	2.611	2.405	2.377	2.338	2.277
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.318	0.322	0.331	0.337	0.342	0.343	0.355	0.358
t <sub>1/2</sub> (días)	2.182	2.153	2.092	2.056	2.028	2.021	1.951	1.935

Tabla 5.41 - Parámetros k y t<sub>1/2</sub> para los isómeros a 10 cm de profundidad

Verano 2005								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.221	0.221	0.221	0.222	0.246	0.247	0.247	0.248
t <sub>1/2</sub> (días)	3.142	3.136	3.131	3.120	2.817	2.812	2.807	2.795
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.246	0.246	0.247	0.248	0.249	0.249	0.250	0.251
t <sub>1/2</sub> (días)	2.818	2.813	2.808	2.796	2.786	2.782	2.776	2.766

Tabla 5.41 - Continuación

Otoño 2005								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.195	0.197	0.198	0.204	0.198	0.201	0.204	0.210
t <sub>1/2</sub> (días)	3.563	3.520	3.497	3.793	3.495	3.454	3.398	3.308
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.223	0.226	0.233	0.237	0.247	0.248	0.257	0.259
t <sub>1/2</sub> (días)	3.102	3.061	2.975	2.924	2.808	2.798	2.702	2.679
Invierno 2006								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.131	0.131	0.134	0.137	0.141	0.143	0.146	0.150
t <sub>1/2</sub> (días)	5.307	5.296	5.171	5.061	4.901	4.857	4.738	4.631
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.142	0.143	0.148	0.150	0.144	0.145	0.148	0.151
t <sub>1/2</sub> (días)	4.888	4.848	4.697	4.621	4.824	4.782	4.693	4.589
Primavera 2006								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.188	0.190	0.192	0.198	0.221	0.223	0.227	0.233
t <sub>1/2</sub> (días)	3.685	3.640	3.618	3.509	3.139	3.103	3.052	2.972
	C <sub>12</sub>				C <sub>13</sub>			
	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6+7Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.240	0.243	0.250	0.255	0.263	0.264	0.274	0.276
t <sub>1/2</sub> (días)	2.887	2.848	2.768	2.720	2.633	2.624	2.534	2.512

Tabla 5.42 - Parámetros k y t<sub>1/2</sub> para los isómeros a 20 cm de profundidad

Verano 2005								
	C <sub>10</sub>				C <sub>11</sub>			
	5Ø	4Ø	3Ø	2Ø	5+6Ø	4Ø	3Ø	2Ø
k (días <sup>-1</sup> )	0.217	0.217	0.217	0.218	0.246	0.246	0.246	0.248
t <sub>1/2</sub> (días)	3.200	3.194	3.189	3.177	2.823	2.818	2.812	2.800

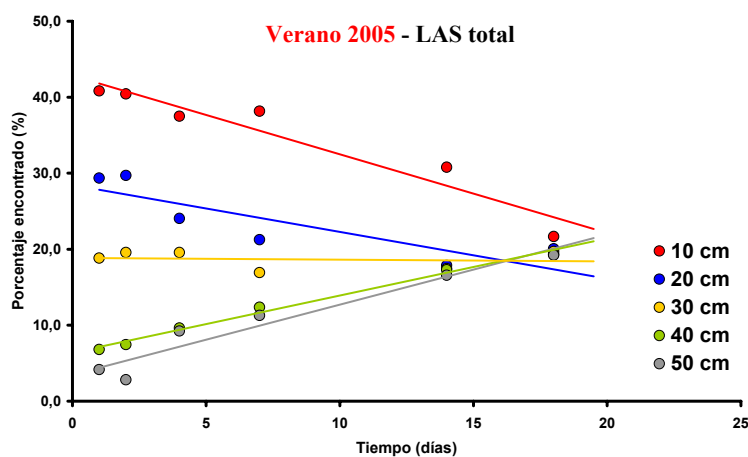
Tabla 5.42 - Continuación

<b>Verano 2005</b>								
	<b>C<sub>12</sub></b>				<b>C<sub>13</sub></b>			
	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6+7Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.230	0.231	0.231	0.232	0.242	0.242	0.243	0.244
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.009	3.003	2.997	2.985	2.863	2.858	2.853	2.842
<b>Otoño 2005</b>								
	<b>C<sub>10</sub></b>				<b>C<sub>11</sub></b>			
	<b>5Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.176	0.178	0.179	0.185	0.174	0.176	0.179	0.183
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.935	3.887	3.862	3.747	3.992	3.945	3.882	3.779
	<b>C<sub>12</sub></b>				<b>C<sub>13</sub></b>			
	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6+7Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.201	0.204	0.209	0.213	0.219	0.220	0.228	0.230
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.452	3.406	3.310	3.253	3.163	3.153	3.045	3.018
<b>Invierno 2006</b>								
	<b>C<sub>10</sub></b>				<b>C<sub>11</sub></b>			
	<b>5Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.126	0.127	0.130	0.133	0.137	0.139	0.142	0.145
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	5.481	5.470	5.340	5.227	5.044	4.999	4.876	4.767
	<b>C<sub>12</sub></b>				<b>C<sub>13</sub></b>			
	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6+7Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.137	0.138	0.142	0.145	0.138	0.139	0.142	0.145
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	5.074	5.033	4.875	4.796	5.024	4.980	4.887	4.779
<b>Primavera 2006</b>								
	<b>C<sub>10</sub></b>				<b>C<sub>11</sub></b>			
	<b>5Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.175	0.177	0.178	0.184	0.194	0.196	0.199	0.205
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.956	3.907	3.884	3.767	3.578	3.536	3.478	3.387
	<b>C<sub>12</sub></b>				<b>C<sub>13</sub></b>			
	<b>5+6Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>	<b>5+6+7Ø</b>	<b>4Ø</b>	<b>3Ø</b>	<b>2Ø</b>
<b>k (días<sup>-1</sup>)</b>	0.208	0.210	0.217	0.220	0.234	0.235	0.244	0.246
<b>t<sub>1/2</sub> (días)</b>	3.338	3.293	3.201	3.146	2.957	2.947	2.846	2.812

Una vez más se pudo comprobar tanto el principio de la distancia propuesto

por Swisher<sup>41</sup>, que indica que la velocidad de degradación aumenta cuando se incrementa la distancia del grupo metilo terminal al lugar donde se acopla el grupo sulfonilo, o cuando se incrementa la longitud de la cadena alquílica, así como la influencia causada por las variables características de cada estación ya comentada anteriormente.

Asimismo, de una manera global, al representar los porcentajes de *LAS* total encontrado a las diferentes profundidades analizadas, a lo largo de todos los tratamientos realizados (*Figuras 4.91 - 4.94*), se puede observar que la distribución de esta sustancia en las distintas profundidades va haciéndose progresivamente homogénea, convergiendo hacia un valor común, correspondiente en términos absolutos a una concentración de  $0.409 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de *LAS* total, que representa la cantidad residual de *LAS* remanente en la zona examinada (10 - 60 cm).



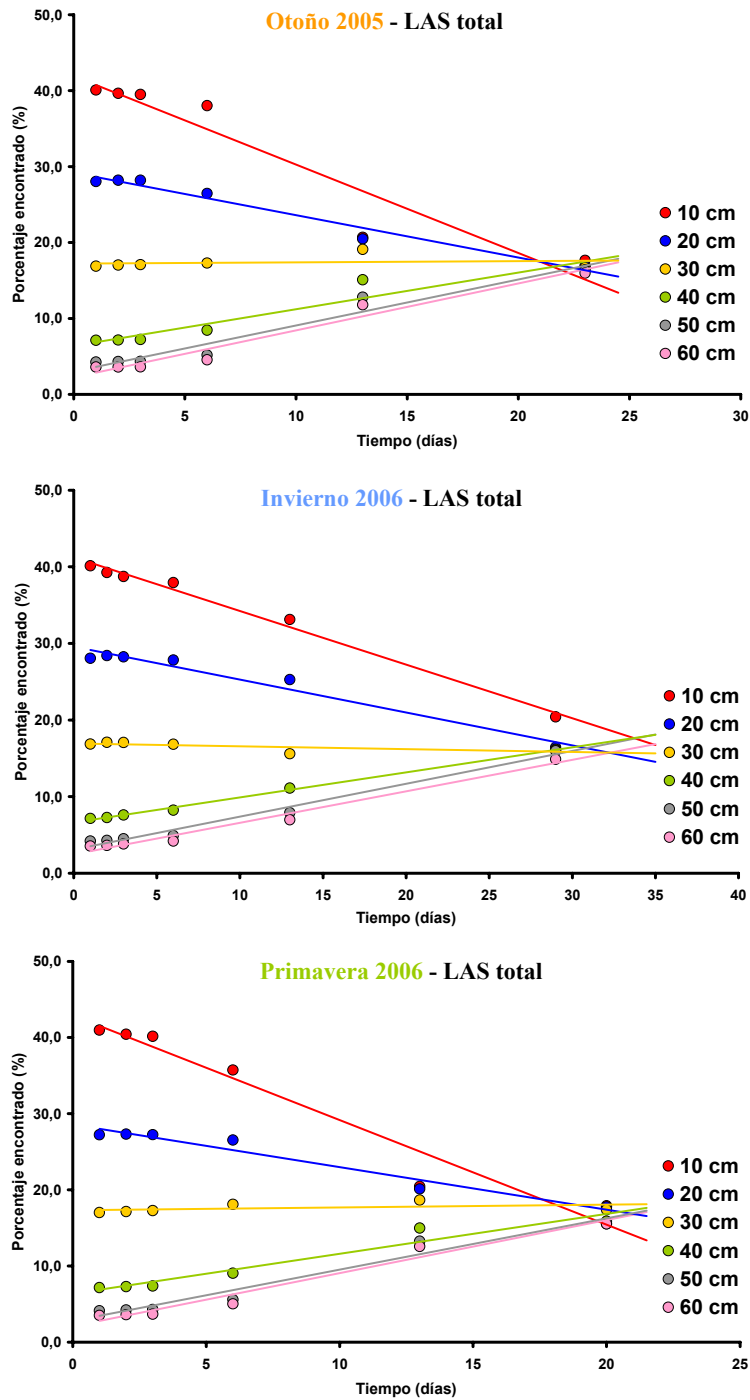


Figura 5.91 - Cambio de distribución del LAS total en todos los tratamientos

El análisis de los resultados permite concluir que la metodología y sistemática adoptada para llevar a cabo el estudio del comportamiento del *LAS* en el suelo agrícola de la Vega de Granada ha sido adecuada para alcanzar los objetivos propuestos en el planteamiento de la Memoria de Doctorado.





---

---

## **CONCLUSIONES**

---

---



La investigación desarrollada a lo largo de esta Memoria ha conducido a las siguientes conclusiones:

⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y determinación del sulfonato de alquilbenceno lineal a diferentes grados de resolución (*LAS* total, homólogos C<sub>10</sub> - C<sub>13</sub> e isómeros) en agua de pozo y agua residual.

El método propuesto conlleva un primer tratamiento de las muestras con una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. Por último, los compuestos estudiados son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Se trata de un método sencillo capaz de detectar niveles muy bajos de los analitos. Los límites de detección para los homólogos C<sub>10</sub> - C<sub>13</sub> fueron del orden de 2.0 - 4.0 µg·L<sup>-1</sup>. Para los correspondientes isómeros los límites de detección están comprendidos entre 1.0 - 5.0 µg·L<sup>-1</sup>.

⇒ Se ha puesto a punto y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de una sonda ultrasónica, para la extracción de los diferentes sulfonatos de alquilbenceno lineales en suelo agrícola de la Vega de Granada.

El método propuesto conlleva un primer tratamiento de las muestras mediante la extracción asistida por ultrasonido. A continuación, los extractos obtenidos son sometidos a una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida.

Por último, los compuestos estudiados son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Se trata de un método rápido, reproducible, capaz de detectar niveles muy bajos del analito y que permite procesar varias muestras simultáneamente. La metodología analítica desarrollada permite la posibilidad de determinar los analitos con límites de detección, para los homólogos C<sub>10</sub> - C<sub>13</sub>, comprendidos entre 4.0 - 10.0 µg·kg<sup>-1</sup>.

- ⇒ Se ha puesto a punto una nueva metodología para abordar el estudio del comportamiento del LAS en suelo agrícola, que incluye las siguientes fases: estudios de laboratorio (en discontinuo o tanque y en continuo o columna) y estudios estacionales de campo (mediante toma de muestras en suelo con barrena y de agua con hidrocaptadores).
- ⇒ Como paso previo, se ha caracterizado tanto el suelo utilizado en los estudios de laboratorio y campo, así como el agua utilizada en los riegos. Debido a la influencia de las propiedades del suelo en los procesos de adsorción y transporte, se han determinado sus características químicas (pH, materia orgánica, capacidad de cambio catiónico, contenido en aniones y cationes solubles y en nitrógeno total) y sus propiedades físicas (textura, porosidad, humedad y conductividad hidráulica). Los resultados obtenidos han permitido clasificar el suelo como fluvisol calcáreo.
- ⇒ En los ensayos de laboratorio en discontinuo (tanque) se han establecido las cinéticas e isoterms para los procesos de adsorción/desorción de los homólogos del LAS. Así, se ha comprobado la relativa rapidez con que todos los componentes del

analito se adsorben, alcanzando el equilibrio a las dos horas. El proceso de desorción transcurre algo más lento, con un tiempo de equilibrio de cuatro horas. Ambos procesos de adsorción y desorción se ajustan al modelo de Freundlich. Las constantes determinadas ponen de manifiesto la reversibilidad del proceso adsorción/desorción, así como el hecho de que la intensidad de la adsorción se incrementa al aumentar la longitud de la cadena alquílica de los correspondientes homólogos.

- ⇒ Los ensayos en continuo realizados en columnas de suelo permiten obtener las curvas de rotura. El modelo bizonal ajusta satisfactoriamente los resultados experimentales de adsorción/desorción de los diferentes homólogos del LAS. Los valores del coeficiente de retención ( $R$ ) son del mismo orden de magnitud que los calculados utilizando las constantes de adsorción obtenidas a partir de los resultados en discontinuo (tanque). Asimismo, el modelo satisface los resultados de las experiencias cinéticas, en lo que se refiere a la instantaneidad del proceso de adsorción del LAS en el suelo estudiado.
  
- ⇒ Para llevar a cabo las experiencias estacionales de campo se preparó una parcela experimental de 2500 m<sup>2</sup>. La toma de muestras de agua se realizó mediante el empleo de hidrocaptos a diferentes profundidades. Para la selección de los mismos, se realizó un estudio espectrofluorimétrico de la retención del LAS sobre los distintos materiales empleados en su fabricación (cerámica, teflón, acero inoxidable, cobre). Los más adecuados fueron los diseñados por este grupo de investigación, que consistían en un tubo de PVC de 50 mm

de diámetro, sellado en su extremo inferior con una cápsula de acero inoxidable y, en el extremo superior, un tapón perforado en su centro donde se le había introducido un tubo metálico de unos 5 mm de diámetro, a través del cual se efectuaba la aplicación del vacío mediante una bomba eléctrica y la toma de muestra.

Una vez establecido el comportamiento hidrodinámico de los hidrocaptos mediante el uso de KBr como trazador, se procedió a la realización de un ensayo consistente en una aportación puntual de *LAS* a la parcela y estudiar su evolución tras la realización de riegos periódicos. De los resultados obtenidos, puede concluirse que sólo se encontró *LAS* en las muestras de agua obtenidas de los hidrocaptos situados a 25 cm de profundidad, comprobando que el suelo de la Vega de Granada presenta una elevada capacidad de fijación de *LAS*, debido a su naturaleza y principalmente a su textura fina, a los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, que, junto con los óxidos de magnesio, fijan los aniones en disolución.

En los ensayos de campo (muestras de suelos), se ha podido comprobar que el analito presenta escasa capacidad de lixiviación, reteniéndose fundamentalmente en la capa arable (70 - 93% en los primeros 20 cm, dependiendo de la cantidad aplicada). Este resultado está en total concordancia con la fuerte adsorción de los diferentes homólogos del *LAS* descrita en apartados anteriores. Por otra parte en los resultados analíticos del suelo obtenidos a los cinco meses de la aplicación del *LAS* a la parcela experimental, no se observa cantidad significativa alguna de los homólogos del *LAS* estudiado a las profundidades ensayadas (0 - 100 cm), lo que demuestra que tiene

lugar su total biodegradación. Esta hipótesis está corroborada por el hecho de que nunca se ha encontrado ningún residuo de *LAS* en los repetidos controles analíticos mensuales realizados al agua de la zona saturada.

Se ha estudiado el comportamiento del *LAS* y de la microbiota en campo, según las condiciones climáticas de las diferentes estaciones del año. Para ello se realizó una aplicación superficial del analito y una serie de riegos (uno a la semana) de acuerdo con las prácticas agrícolas de la zona. En todas las campañas, la colecta del suelo fue realizada a distintas profundidades (2.0; 10.0; 20.0; 30.0; 40.0; 50.0; 60.0 cm). El tiempo empleado en cada experiencia fue el necesario para que la concentración de *LAS* alcanzase un valor próximo al determinado para el blanco (cantidad residual del *LAS* en el suelo).

Analizando los datos de concentración de *LAS* en suelo a las distintas profundidades ensayadas, en todas las campañas estudiadas, se puede constatar que la desaparición del *LAS* en suelo es relativamente rápida, siendo las cantidades finales encontradas muy bajas transcurrido un periodo de tiempo medio de tres semanas desde su aplicación. En todos los casos las curvas de degradación se ajustan a una cinética de primer orden. Al establecer una relación entre las constantes de degradación ( $k$ ) para el *LAS* total y sus homólogos, con las distintas profundidades estudiadas, se constata, que la velocidad de degradación es mayor cuanto más cerca de la superficie se encuentran los analitos, de forma que  $k_{2\text{cm}} > k_{10\text{cm}} > k_{20\text{cm}} > k_{30\text{cm}} > k_{40\text{cm}} > k_{50\text{cm}} > k_{60\text{cm}}$ . Esta tendencia se cumple en todos los tratamientos realizados.

Se observa, asimismo, que conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica, la constante de degradación ( $k$ ) también aumenta, de modo que se puede apreciar que  $k_{C_{13}} > k_{C_{12}} > k_{C_{11}} > k_{C_{10}}$ . Esta observación se cumple en todos los tratamientos realizados (Verano 2005, Otoño 2005, Invierno 2006, Primavera 2006, Riego Sucesivo 2006). Estos resultados, están en concordancia con el postulado de Swisher<sup>1</sup> (1987): “Principio de la distancia”.

Los valores del tiempo de vida media para la degradación del LAS total están comprendidos entre 1.92 y 10.41 días en el suelo estudiado. Estos tiempos están en concordancia con los estudios realizados por otros autores que también indican una rápida biodegradación donde un 80% del LAS añadido (empleando concentraciones de 8.0, 22.0 y 62.0 mg·kg<sup>-1</sup> LAS total en suelo) fue degradado en un plazo de 2 semanas.

La velocidad de degradación de cada homólogo varió en función de las estaciones estudiadas, de forma que la campaña de Verano 2005 > Primavera 2006 ≈ Otoño 2005 > Invierno 2006. Este comportamiento es coherente con el valor de la temperatura media de cada estación que a su vez, como se ha comprobado, incide sobre la población bacteriana del suelo.

La comparación de los análisis microbiológicos del suelo antes y después de las diferentes aplicaciones de LAS permiten afirmar que no hubo cambios significativos en la población bacteriana por lo que se descarta todo tipo de acción germicida a las concentraciones

---

<sup>1</sup> Swisher R.D., *Surfactants biodegradation*, 2º Ed. Marcell Dekker, New York, USA, 1987



ensayadas en la parcela agrícola.

Del análisis de los resultados obtenidos a lo largo de todas las campañas realizadas, se puede afirmar que en el suelo de la Vega de Granada, las bacterias se distribuyen según una curva del tipo decreciente. En ella, la densidad microbiana alcanza un máximo muy cerca de la superficie y disminuye progresivamente con la profundidad.

Se ha realizado análisis de la biodegradación de los isómeros, comparando los tratamientos en los primeros 20 cm de profundidad. Se ha determinado la constante de degradación ( $k$ ) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) para cada isómero. Se ha demostrado que la velocidad de degradación aumenta cuando se incrementa la distancia del grupo metilo terminal al lugar donde se acopla el grupo sulfonilo, y cuando se incrementa la longitud de la cadena alquílica.



---

---

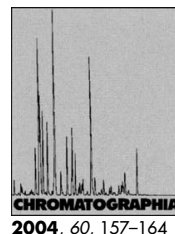
**ANEXOS**

---

---



## Development of Methodologies for Different Degrees of Resolution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in Groundwater and Wastewater by Liquid Chromatography Using Sodium Dodecyl Sulphate



M. del Olmo<sup>1,✉</sup>, A. Garbalo<sup>1</sup>, M. Nimer<sup>1</sup>, I. López<sup>2</sup>, J. A. de Ferrer<sup>2</sup>, J. L. Vilchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry, University of Granada. Avda. Fuentenueva S/N. 18071 Granada, Spain; E-Mail: mdlmo@ugr.es

<sup>2</sup>Petroquímica Española S.A., 28042 Madrid, Spain

Received: 2 February 2004 / Revised: 6 April 2004 / Accepted: 20 April 2004  
Online publication: 9 July 2004

### Abstract

Linear alkylbenzenesulfonates (LAS) are used extensively as surfactants in consumer formulations as a complex mixture of homologues and isomers. Separation of homologues and isomers of LAS is important in industrial and environmental samples in order to establish their behaviour. Here we present a HPLC methodology with fluorescent detection (FD) for the determination of the homologues and isomers as well as the sum of LAS present. The quantification of total LAS was achieved without a column, using the liquid chromatograph as a FIA system. The different homologues were separated using a Lichrospher-100 RP-8 column of 125 × 4 mm using a linear gradient of methanol and 30.0 mM sodium dodecyl sulphate (SDS), increasing the methanol content linearly from 55% to 70% in 16 min. The resolution of isomers was carried out by using two coupled Lichrospher-100 RP-18 columns of 250 × 4 mm. Elution of isomers was done with a gradient of flow rate from 1.0 to 0.25 mL min<sup>-1</sup> using a linear gradient of acetonitrile and 5.0 mM SDS increasing the acetonitrile content linearly from 20% to 40% in 160 min. The methods were validated and applied satisfactorily to the determination of LAS in urban wastewater and ground water.

### Keywords

Column liquid chromatography  
Solvophobic association  
Linear alkylbenzenesulfonates  
Wastewater and groundwater

### Introduction

Linear alkylbenzene sulfonate is an anionic surfactant introduced in 1964 as the readily biodegradable replacement for highly branched alkylbenzene sulphonates (ABS). The commercial LAS is a mixture which consists of 20 different compounds of closely related isomers and homologues, each containing an aromatic

ring sulphonated at the *para* position and attached to a linear alkyl chain which usually varies from 10 to 13 carbon atoms [1].

The European consumption of LAS in detergents was about 330 kton in 2000. This represents more than 80% of the total European consumption of LAS, which was estimated to be about 400 kton in that year [2]. Widespread use

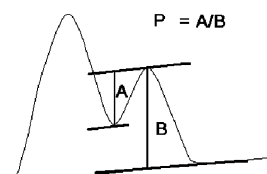
of detergents means that LAS is always present in urban wastewater. Although the majority of this waste stream is treated via domestic wastewater treatment plants and the load of chemicals to the receiving surface waters is significantly reduced, the remaining fraction reaches the surface water and the agricultural land as does the full concentration in the sewage effluents used directly as irrigation water.

Although LAS is fully biodegradable under aerobic conditions, their sorption and anaerobic persistence result in an accumulation of LAS in soil. In terrestrial environments, LAS may be inhibitory to plants and soil fauna, which is an important basis for soil fertility and nutrient cycling [3]. Also, due to their surface-active properties, LAS interact with cell membranes, proteins and enzymes of acuity organisms, leading to disturbances of biological functions; furthermore, the decrease in surface tension makes the attack of other toxic pollutants easier.

The determination of the total LAS content is sufficient for general assessment of the pollution of wastewater and surface water. Separation of homologues and isomers of LAS is important only in industrial and environmental samples in order to explain their behaviour. In fact, aquatic toxicity and biological degradation depend on the alkyl chain length and the position of the phenyl ring. The different isomers and homologues are probably degraded with different rates and through different mechanisms.

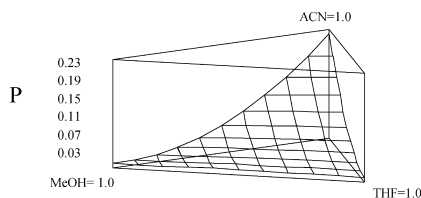
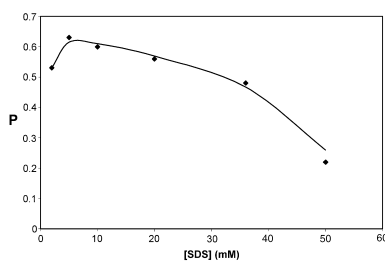
**Table 1.** Distribution of linear alkyl chains and positional isomers for commercial LAS

Homologues	Isomers	% (w/w)
C <sub>10</sub>	5 $\varnothing$ C <sub>10</sub>	3.33
	4 $\varnothing$ C <sub>10</sub>	2.55
	3 $\varnothing$ C <sub>10</sub>	2.63
	2 $\varnothing$ C <sub>10</sub>	2.59
C <sub>11</sub>	5-6 $\varnothing$ C <sub>11</sub>	15.78
	4 $\varnothing$ C <sub>11</sub>	7.73
	3 $\varnothing$ C <sub>11</sub>	7.49
	2 $\varnothing$ C <sub>11</sub>	7.17
C <sub>12</sub>	5-6 $\varnothing$ C <sub>12</sub>	15.55
	4 $\varnothing$ C <sub>12</sub>	5.47
	3 $\varnothing$ C <sub>12</sub>	5.29
	2 $\varnothing$ C <sub>12</sub>	5.11
C <sub>13</sub>	6-7 $\varnothing$ C <sub>13</sub>	6.65
	5 $\varnothing$ C <sub>13</sub>	4.17
	4 $\varnothing$ C <sub>13</sub>	3.02
	3 $\varnothing$ C <sub>13</sub>	2.78
	2 $\varnothing$ C <sub>13</sub>	2.38

**Fig. 1.** The resolution parameter  $P$ 

Several species of microorganisms are generally responsible for the transformation of even one single isomer [4]. Furthermore, the isomeric distribution gives information about the manufacturing process and can be considered as a fingerprint of the product.

During the last decades the determination of LAS in aquatic environments has been extensively studied. Reversed-phase HPLC using UV [5, 6] or fluorescence [7] detection must be considered the routine method for LAS analysis. The application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry [8-10] has allowed the almost specific characterization and quantitation of individual phenyl-isomers of technical LAS-mixtures previously derivatized. Heinig et al. first proposed the use of Capillary Electrophoresis for isomeric separation of LAS based on host-guest interactions with  $\alpha$ -cyclodextrin [6] but the limited detection sensitivity and disturbances from matrix components prevented the determination of LAS in environmental samples. Later, the authors achieved the almost complete resolution of LAS isomers by CE based

**Fig. 2.** Estimated response surface for  $P$  parameter vs. mobile phase composition**Fig. 3.** Relationship between the SDS concentration in mobile phase and the resolution parameter  $P$  calculated for 3 $\varnothing$  and 4 $\varnothing$  isomers of LAS homologue C<sub>11</sub> using a 250 mm octadecylsilyla column and acetonitrile/water as mobile phase

on the formation of association complexes with SDS [11]. More recently mass spectrometry has been proposed also as a detector in CE [12] for the determination of LAS homologues. Most available methodologies are not adequately validated and basic analytical parameters are not frequently included.

Doubts on the validation issues on the above mentioned methods and the obvious need to insist on the general area of validation methods related to LAS has prompted us to undertake this research. Moreover, we propose the modification of the conventional methodologies using RP-HPLC with fluorescent detection for the quantification of total LAS and resolving homologues and most isomers included in the commercial LAS, through the formation of association complexes with SDS. The methods for different degrees of resolution of LAS are applied satisfactorily to the analysis of the chemical in urban wastewater and groundwater.

## Experimental

### Chemicals

Commercial LAS, purchased from Petroquímica Española S.A. (Madrid, Spain), was an aqueous sodium salt solution with a LAS content of 9.6% (w/w). The average molecular weight of the Na-LAS was 341.4 g mol<sup>-1</sup>, and the distribution of linear alkyl chains and positional isomers is shown in Table 1.

The sorbing material used for solid phase extraction (SPE) was C-18 Lichrolut from Merck (Darmstadt, Germany) HPLC grade methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran used as mobile phase components were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Sodium dodecyl sulphate (SDS) from Fluka (Buchs, Switzerland), cetylpyridinium bromide, hexadecyltrimethylammonium bromide and triton X-100 from Sigma (St. Louis, USA) were tested as surfactants. Analytical grade triethylamine (TEA) from Panreac, acetic acid (Panreac) and ammonium acetate (Sigma) were used for ion pair formation. Sodium

perchlorate supplied by Merck and  $\beta$ -cyclodextrin (Sigma) were checked as well as phase modifying agents.

### Apparatus

The chromatographic apparatus used was an Agilent 1100 series liquid chromatograph equipped with a fluorescence detector (flow cell volume 8  $\mu$ L), an automatic sample injector with a loop of up to 100  $\mu$ L, quaternary pump, vacuum degasser and thermostatted column compartment. The detector was linked to a data system (Agilent HPLC Chem Station) for data acquisition and storage.

The process of solid-phase extraction was performed with a vacuum manifold CRS Inc. (USA) (12 channels) which is fitted to an external Schott Iberica MZ 2C pump using SPE polypropylene cartridges (3 mL) attached to reservoirs with 60 mL capacity.

### Sample Treatment

Groundwater and urban wastewater samples were passed through glass-fibre filters (0.2  $\mu$ m; Whatman), 1% of formaldehyde (37% Merck) was added and the mixtures were stored at 4  $^{\circ}$ C. Volumes of 100 mL of each sample were treated by SPE using C<sub>18</sub> cartridges filled with 500 mg of solid phase and reservoirs with 60 mL capacity. Firstly, the cartridge was preconditioned with 5 mL of methanol followed by 5 mL of water and then an aliquot of 100 mL of water sample or reference standard solution was passed through the column. Then 3 mL of a methanol/water 35/65 solvent mixture was used to rinse the cartridge. The retained materials were then eluted with 3 mL of methanol and transferred to a 5 mL volumetric flask and deionized water was added up to the mark.

### Chromatographic Separation and Detection

100  $\mu$ L of extracts containing the LAS, in 60% methanol solution in water, were injected in the chromatograph using the experimental and instrumental conditions specified below, according to the requisites of the analysis.

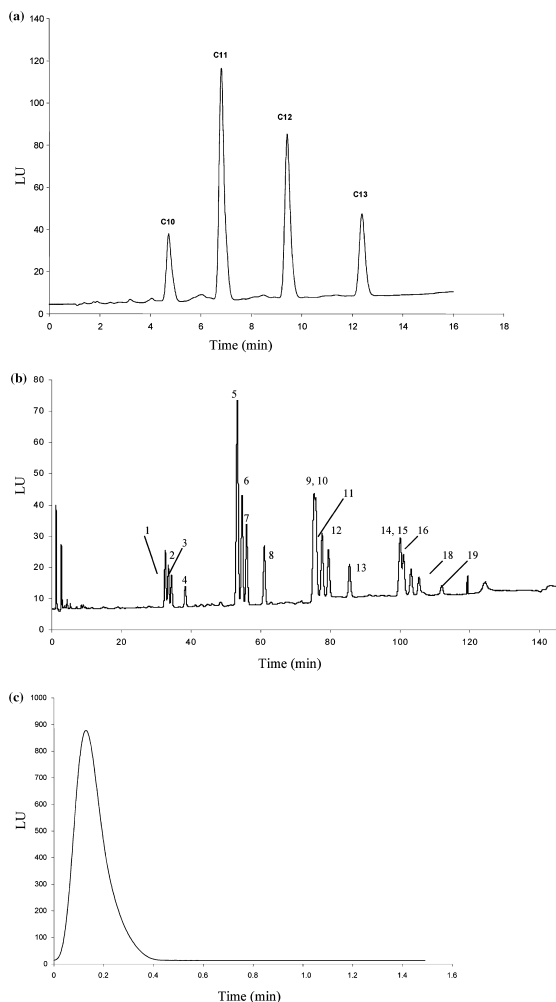


Fig. 4. a) LC separation of LAS homologues, b) LC separation of LAS isomers 1 = 5 $\mathcal{O}$ C10, 2 = 4 $\mathcal{O}$ C10, 3 = 3 $\mathcal{O}$ C10, 4 = 2 $\mathcal{O}$ C10, 5 = 5 $\gamma$ 6 $\mathcal{O}$ C11, 6 = 4 $\mathcal{O}$ C11, 7 = 3 $\mathcal{O}$ C11, 8 = 2 $\mathcal{O}$ C11, 9 = 6 $\mathcal{O}$ C12, 10 = 5 $\mathcal{O}$ C12, 11 = 4 $\mathcal{O}$ C12, 12 = 3 $\mathcal{O}$ C12, 13 = 2 $\mathcal{O}$ C12, 14 = 7 $\mathcal{O}$ C13, 15 = 6 $\mathcal{O}$ C13, 16 = 5 $\mathcal{O}$ C13, 17 = 4 $\mathcal{O}$ C13, 18 = 3 $\mathcal{O}$ C13, 19 = 2 $\mathcal{O}$ C13 and c) Diagram corresponding to total LAS. Results obtained by applying the proposed procedures to a 10 mg L<sup>-1</sup> total LAS solution.

### Determination of Total LAS

The quantification of total LAS was achieved without a column, using the

chromatograph as a FIA system. The mobile phase used was acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and the system was thermostatted at 20  $^{\circ}$ C.

**Table 2.** Analytical parameters for total LAS and homologues

Parameter	Total LAS	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>
Slope ( <i>b</i> ) (L mg <sup>-1</sup> )	2861.56	818.95	810.32	773.16	719.67
S <sub>y</sub> (L mg <sup>-1</sup> )	35.50	10.49	9.31	12.13	17.04
Intercept ( <i>a</i> )	1140.81	16.21	53.75	28.54	-0.17
S <sub>x</sub>	188.66	5.84	17.84	19.14	16.83
Linear Range (µg L <sup>-1</sup> )	200.0-10000	21.4-1110	52.4-3817	69.9-3142	28.9-1900
QL (µg L <sup>-1</sup> )	200.00	21.4	52.4	69.9	28.9
DL (µg L <sup>-1</sup> )	60.00	6.40	15.70	20.90	8.70
R <sup>2</sup> (%)	99.89	99.93	99.95	99.90	99.76
RSD (%)	9.86	1.02	0.59	4.56	7.81
S <sub>yx</sub>	404.90	9.93	30.32	32.53	28.61
P <sub>of</sub> (%)	62.66	30.61	19.96	94.78	97.36

**Table 3.** Analytical parameters for positional isomers of LAS

Parameter	Slope ( <i>b</i> ) (L mg <sup>-1</sup> )	Intercept ( <i>a</i> )	R <sup>2</sup> (%)	S <sub>yx</sub>	DL (µg · L <sup>-1</sup> )	QL (µg · L <sup>-1</sup> )	P <sub>of</sub> (%)
2∅C <sub>10</sub>	1602.80	5.99	99.89	5.24	2.3	7.7	9.10
3∅C <sub>10</sub>	1894.52	8.33	99.88	6.74	2.0	6.8	5.16
4∅C <sub>10</sub>	2564.07	14.24	99.91	7.68	2.9	9.7	9.91
5∅C <sub>10</sub>	1943.84	9.41	99.90	7.98	0.8	2.5	6.70
2∅C <sub>11</sub>	1208.20	11.40	99.93	8.67	4.1	13.6	71.81
3∅C <sub>11</sub>	2429.23	34.25	99.92	20.42	1.7	5.8	35.40
4∅C <sub>11</sub>	3044.44	44.27	99.93	24.23	2.6	8.7	27.84
(5-6)∅C <sub>11</sub>	3101.99	74.12	99.93	50.15	7.6	25.3	20.58
2∅C <sub>12</sub>	2019.57	17.36	99.72	21.02	4.9	16.2	97.73
3∅C <sub>12</sub>	2651.60	22.88	99.80	24.40	2.3	7.7	96.39
4∅C <sub>12</sub>	3305.47	34.36	99.83	29.13	0.7	2.4	92.51
(5-6)∅C <sub>12</sub>	3269.66	97.33	99.84	78.16	5.2	17.3	89.93
2∅C <sub>13</sub>	1805.29	6.08	99.45	12.23	2.9	9.8	99.30
3∅C <sub>13</sub>	2644.48	4.45	99.48	20.45	33.1	110.3	98.66
4∅C <sub>13</sub>	3245.30	5.10	99.48	27.51	13.2	44.0	98.61
(5, 6, 7)∅C <sub>13</sub>	3583.06	47.60	99.62	90.60	10.5	35.1	98.74

**Determination of Homologues**

The different homologues were separated using a LiChrospher-100 RP-8 column of 125x4 mm with a particle size of 5 µm (Agilent, Palo Alto, USA). Elution of homologues was done at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> using a linear gradient of methanol and 30.0 mM SDS increasing the methanol content linearly from 55% to 70% in 16 min. The column was thermostatted at 40 °C.

**Determination of Isomers**

The resolution of isomers was carried out by using two coupled LiChrospher-100 RP-18 columns of 250 x 4 mm I.D (Merck). Elution of isomers was done with a gradient of flow rate from 1.0 to 0.25 mL min<sup>-1</sup> using a linear gradient of acetonitrile and 5.0 mM SDS increasing the acetonitrile content linearly from 20% to 40% in 160 min. The columns were thermostatted at 40 °C.

The detection parameters were λ<sub>ex</sub> = 230 nm for the three methodologies. λ<sub>em</sub> = 290 nm for homologues and

308 nm for total LAS and isomers and PMT gain 12.

**Results and Discussion**

So far, the determination of total LAS is currently estimated by adding the areas corresponding to the different homologues or isomers when chromatographic techniques are used. Performing CE in aqueous buffers, the sum of LAS can be determined directly [6]. Here, we propose the determination of total LAS by HPLC without using any column, as a FIA system. We developed this method for rapid laboratory LAS testing, particularly in laboratories analyzing large numbers of samples, as an efficient screening methodology.

To deal with the resolution of homologues and isomers of LAS by HPLC, the resolution parameter  $P = a/b$  showed in Fig. 1 (*a*: distance between the top of the minor peak and the valley and *b*: height of the minor peak) was used in order to evaluate the separation of poorly resolved peaks in the optimisation of the

experimental variables tested in this study.

Firstly the stationary phase was selected between several different kinds: -NH<sub>2</sub> as polar column material tested in normal phase mode (isopropanol/dichloromethane as mobile phase), reversed phase mode (acetonitrile/water as mobile phase) and anionic exchange mode (acetic acid solution at pH = 4.5). As non-polar column material octylsilica (Lichrospher and Zorbax XDB from Agilent) and octadecylsilica (Lichrospher and Chromolith from Merck) were checked. For homologue determination LiChrospher C8 was selected because with Zorbax ZDB, 2-C isomer is resolved as well for every homologue. Isomeric resolution is better achieved using two coupled LiChrospher C18 columns.

The isoelotropic model [13] was used for the selection of the mobile phase composition. Acetonitrile, tetrahydrofuran, methanol and water were tested in binary, ternary and quaternary mixtures established according to mixture design. The maximum resolution was achieved with acetonitrile/water whereas methanol/water showed the poorest resolution (Fig. 2). For total LAS determination the maximum fluorescent signal was achieved using acetonitrile as mobile phase.

In all cases LAS separation requires electrolyte addition to force interaction with the stationary phase. Sodium perchlorate has prevailed from the beginning [5] as a salting out agent although ion-pair RPLC is also an important alternative. Sodium perchlorate, triethylamine/acetic acid, ammonium acetate and non-ionic, cationic and anionic surfactants were checked as modifiers. The solvophobic association of LAS with SDS [11] produced better results in both cases. Fig. 3 shows the relationship between the SDS concentration in mobile phase and the resolution parameter P calculated for 3∅ and 4∅ isomers of LAS homologue C11 using a 250 mm octadecylsilica column and acetonitrile/water as mobile phase. The P parameter is maximum for a SDS concentration of 5 mM, decreasing markedly when SDS concentration increases.

Column temperature and pH of the mobile phase were also tested as experimental variables. While pH affected neither resolution, retention time nor sensitivity, an increase of the work temperature caused shorter retention time and so, poorer resolution. We established



Table 4. Numerical values of parameters implied in standard addition methodology for total LAS and homologues

		<i>b</i>	<i>a</i>	<i>S</i> <sub>ys</sub>	<i>b</i> <sub>p</sub>	<i>t</i> <sub>calc</sub>	<i>P</i> (%)	<i>C</i> <sub>SC</sub>	<i>C</i> <sub>AC</sub>	<i>t</i> <sub>calc</sub>	<i>P</i> (%)
LAS WW	SC	2861.56	1140.81	404.90				7.404		0.815	54.12
	AC	2983.12	22087.5	317.92	2922.35	0.153	88.26		7.392		
	YC		1286.15	475.26							
GW	SC	2861.56	1140.81	404.90				2.011		1.76	20.15
	AC	2752.10	5534.27	524.18	2856.52	0.135	89.76		1.980		
	YC		917.29	784.36							
C <sub>10</sub> WW	SC	818.94	16.21	9.93				0.989		0.319	75.760
	AC	872.49	820.41	24.63	844.80	1.981	8.801		0.985		
	YC		-0.65	13.03							
GW	SC	818.94	16.21	9.93				0.228		0.425	68.205
	AC	818.67	191.61	2.97	818.81	0.023	98.197		0.231		
	YC		2.47	2.04							
C <sub>11</sub> WW	SC	810.31	53.75	30.32				2.948		0.037	97.145
	AC	831.40	2438.93	64.01	820.49	0.999	35.104		2.950		
	YC		33.34	44.51							
GW	SC	810.31	53.75	30.32				0.759		0.107	91.768
	AC	805.74	630.06	3.88	808.11	0.449	66.718		0.761		
	YC		11.90	16.48							
C <sub>12</sub> WW	SC	773.16	28.54	32.53				2.222		1.298	23.058
	AC	791.89	1781.32	53.79	782.21	0.812	44.330		2.265		
	YC		20.28	8.25							
GW	SC	773.16	28.53	32.52				0.562		0.701	50.320
	AC	747.53	456.29	3.26	760.78	1.935	9.428		0.548		
	YC		24.51	27.40							
C <sub>13</sub> WW	SC	719.67	-0.17	28.60				1.245		0.565	58.765
	AC	715.07	924.33	19.50	717.45	0.206	84.244		1.257		
	YC		21.19	6.19							
GW	SC	719.67	-0.17	28.60				0.328		2.002	8.025
	AC	662.56	230.55	8.84	692.09	2.874	2.385		0.289		
	YC		10.72	13.45							

WW: Wastewater, GW: Groundwater; *a*, intercept; *b*(L mg<sup>-1</sup>), slope; *S*<sub>ys</sub> regression standard deviation; *b*<sub>p</sub>(L mg<sup>-1</sup>), pooled slope of SC and AC; *C*<sub>SC</sub>(mg L<sup>-1</sup>), sample analyte concentration from SC; *C*<sub>AC</sub>(mg L<sup>-1</sup>), sample analyte concentration from AC; *t*<sub>calc</sub>, statistic for slope and sample analyte concentrations, respectively; *p*(%), *p*-value for each *t*-test.

40 °C as optimum column temperature because lower values increased the viscosity of the mobile phase. In the case of total LAS, the absence of a column permitted temperatures as low as 20 °C.

The volume of sample injected and the flow-rate were optimised in order to get maximum resolution and sensitivity. Resolution of isomeric bands was unaffected for higher sample volumes while sensitivity increased with the volume injected; consequently 100 µL volume was used in all cases. The flow-rate of the mobile phase used for determination of total LAS and homologues was 1.0 mL min<sup>-1</sup> as a compromise between sensitivity and analysis time. The flow-rate for isomeric resolution was tested in the interval 0.25–1.0 mL min<sup>-1</sup>. The fluorescent signal and resolution increased when the flow-rate decreased. Consequently,

a flow-rate of 0.25 mL min<sup>-1</sup> provides maximum sensitivity and resolution but the analysis time is very high. In order to get shorter time different linear gradients were tested. Taking into account that the resolution is worse for C<sub>13</sub>-isomers which elute at the end, the best results were obtained for a decreasing gradient of the flow-rate from 1.0 to 0.25 mL min<sup>-1</sup> in 150 min. The excessively long separation time required for isomeric resolution indicate its application for specific purposes while the methodologies developed for homologues and total LAS are highly recommended for routine purposes.

Spectroscopic variables such as excitation and emission wavelengths and photomultiplier tube (PMT) gain were studied. The excitation wavelength of 230 nm was used for the three mobile phases. The maximum emission signal suffers a bathochromic shift from meth-

anol/water to acetonitrile/water, the maximum emission wavelength is 290 nm for homologues and 308 nm for isomers and total LAS respectively. The PMT gain of 12 showed the highest signal to noise ratio.

Fig. 4 shows the typical chromatograms obtained with the optimized chromatographic separation for homologues (4a) and isomers (4b) and the diagram for total LAS (4c). The compounds with longer alkyl chains migrate more slowly so the more the phenyl ring position is shifted from the centre to the end of the alkyl chain, the longer the isomer takes to migrate towards the detector. Every isomer can be identified separately for homologue C10, but 5-C and 6-C isomers of C11 and C12 homologues produce a single peak in the chromatogram. For C13 homologue, 5-C isomer is poorly

Table 5. Numerical values of parameters implied in standard addition methodology for isomers

		<i>b</i>	<i>a</i>	<i>S<sub>y,x</sub></i>	<i>b<sub>p</sub></i>	<i>t<sub>calc</sub></i>	<i>C<sub>SC</sub></i>	<i>C<sub>AC</sub></i>	<i>t<sub>calc</sub></i>
2C <sub>10</sub> WW	SC	1602.8	6.03	5.3		0.092 (P= 92.9)	0.209		0.831 (P= 42.98)
	AC	1596.3	339.7	11.18	1616.9			0.207	
	YC		2.9	3.6					
GW	SC	1602.8	6.03	5.3		1.681 (P= 13.67)	0.0499		0.17 (P= 86.95)
	AC	1669.7	85.9	3.76	1667.9			0.049	
	YC		3.1	0.972					
3C <sub>10</sub> WW	SC	1894.6	8.2	6.720		0.562 (P= 59.13)	0.240		0.270 (P= 79.43)
	AC	1843.2	461.3	14.794	1882.4			0.239	
	YC		7.4	3.749					
GW	SC	1894.5	8.2	6.720		2.059 (P= 7.85)	0.0477		0.383 (P= 7.16)
	AC	1991.1	99.1	3.650	1985.3			0.048	
	YC		3.7	1.194					
4C <sub>10</sub> WW	SC	2564.1	14.2	7.685		0.303 (P= 77.07)	0.266		0.389 (P= 77.72)
	AC	2524.9	688.1	21.392	2559.3			0.265	
	YC		6.4	7.555					
GW	SC	2564.1	14.2	7.685		2.419 (P= 5.62)	0.046		1.145 (P= 28.53)
	AC	2704.6	132.2	5.446	2683.0			0.048	
	YC		5.0	1.378					
5C <sub>10</sub> WW	SC	1943.9	9.3	7.947		0.716 (P= 49.73)	0.372		0.535 (P= 60.70)
	AC	1873.8	714.8	20.702	1917.3			0.369	
	YC		0.6	0.910					
GW	SC	1943.8	9.3	7.947		2.192 (P= 6.45)	0.060		1.162 (P= 27.89)
	AC	2052.1	130.5	6.827	2041.3			0.062	
	YC		4.4	1.403					
2C <sub>11</sub> WW	SC	1205.6	11.3	8.621		0.131 (P= 89.98)	0.457		0.647 (P= 53.55)
	AC	1212.9	556.0	26.007	1215.9			0.451	
	YC		5.7	2.884					
GW	SC	1205.6	11.3	8.621		0.157 (P= 88.0)	0.135		0.157 (P= 8.61)
	AC	1201.9	167.3	6.145	1208.2			0.128	
	YC		11.3	6.964					
3C <sub>11</sub> WW	SC	2429.1	34.3	20.385		0.108 (P= 91.72)	0.564		0.846 (P= 42.22)
	AC	2442.0	1385.8	57.327	2458.5			0.556	
	YC		13.7	10.136					
GW	SC	2429.1	34.3	20.385		0.520 (P= 61.93)	0.146		1.707 (P= 12.61)
	AC	2455.3	364.2	11.561	2467.8			0.139	
	YC		17.3	9.938					
4C <sub>11</sub> WW	SC	3044.4	44.3	24.248		0.110 (P= 91.53)	0.646		0.954 (P= 36.81)
	AC	3028.5	1970.4	72.269	3058.2			0.637	
	YC		13.4	9.945					
GW	SC	3044.4	44.3	24.248		0.634 (P= 54.64)	0.152		1.929 (P= 8.98)
	AC	3082.5	469.5	16.075	3095.6			0.144	
	YC		20.0	11.295					
5-6C <sub>11</sub> WW	SC	3101.9	74.0	50.058		0.290 (P= 78.03)	1.478		1.059 (P= 32.03)
	AC	3058.1	4564.9	155.031	3097.4			1.455	
	YC		33.8	31.610					
GW	SC	3101.9	74.0	50.058		0.216 (P= 83.48)	0.310		1.945 (P= 8.67)
	AC	3114.8	972.2	31.549	3136.8			0.294	
	YC		37.2	19.210					
2C <sub>12</sub> WW	SC	2019.6	17.3	20.939		0.478 (P= 64.75)	0.287		0.779 (P= 45.87)
	AC	2071.2	615.7	29.890	2061.6			0.292	
	YC		13.6	1.209					
GW	SC	2019.6	17.3	20.939		0.450 (P= 66.63)	0.089		1.168 (P= 27.66)
	AC	1987.0	184.3	8.668	2003.1			0.083	
	YC		16.0	12.640					

Table 5. (contd.)

		<i>b</i>	<i>a</i>	<i>S<sub>y,x</sub></i>	<i>b<sub>p</sub></i>	<i>t<sub>calc</sub></i>	<i>C<sub>SC</sub></i>	<i>C<sub>AC</sub></i>	<i>t<sub>calc</sub></i>
3∅C <sub>12</sub> WW	SC	2650.3	22.8	24.455		0.956 (P = 37.09)	0.343	0.349	0.771(P = 46.29)
	AC	2792.5	971.7	46.869	2757.5				
	YC		15.3	2.630					
GW	SC	2650.3	22.8	24.455	2650.6	0.141 (P = 89.20)	0.093	0.088	1.174 (P = 27.40)
	AC	2638.8	258.1	10.613					
	YC		23.7	19.247					
4∅C <sub>12</sub> WW	SC	3305.3	34.2	29.052		1.058 (P = 32.51)	0.393	0.398	0.589 (P = 57.21)
	AC	3500.9	1382.1	61.792	3453.6				
	YC		15.2	4.564					
GW	SC	3305.3	34.2	29.052	3325.8	0.126 (P = 90.31)	0.100	0.094	1.286 (P = 23.44)
	AC	3317.2	345.0	12.689					
	YC		30.5	22.852					
5-6∅C <sub>12</sub> WW	SC	3269.6	97.3	78.119		0.477 (P = 64.77)	1.238	1.242	0.197 (P = 84.89)
	AC	3350.1	4198.5	158.444	3339.9				
	YC		54.0	13.524					
GW	SC	3269.6	97.3	78.119	3152.4	1.910 (P = 9.78)	0.301	0.271	2.236 (P = 5.58)
	AC	3078.1	970.2	60.222					
	YC		75.1	54.711					
2∅C <sub>13</sub> WW	SC	1805.3	6.1	12.241		0.672 (P = 52.34)	0.146	0.143	0.663 (P = 52.59)
	AC	1731.9	265.3	11.291	1752.0				
	YC		11.9	1.360					
GW	SC	1805.3	6.1	12.241	1736.71	1.082 (P = 31.51)	0.038	0.035	1.137 (P = 28.86)
	AC	1709.9	68.7	3.627					
	YC		6.2	3.127					
3∅C <sub>13</sub> WW	SC	2644.5	4.3	20.459		0.459 (P = 66.02)	0.173	0.175	0.435 (P = 67.53)
	AC	2716.1	489.2	18.780	2685.4				
	YC		21.4	2.922					
GW	SC	2644.5	4.3	20.459	2586.7	0.528 (P = 61.39)	0.046	0.041	1.237 (P = 25.11)
	AC	2574.2	122.3	10.205					
	YC		14.3	7.812					
4∅C <sub>13</sub> WW	SC	3245.2	5.1	27.427		0.660 (P = 53.03)	0.224	0.236	2.120 (P = 6.68)
	AC	3381.9	699.7	29.775	3032.5				
	YC		19.9	0.446					
GW	SC	3245.2	5.1	27.427	2911.7	0.229 (P = 82.52)	0.055	0.061	1.293 (P = 23.21)
	AC	3208.0	163.1	12.587					
	YC		17.1	11.210					
5,6,7 ∅C <sub>13</sub> WW	SC	3583.0	47.6	90.602		0.661 (P = 52.98)	0.802	0.797	0.346 (P = 73.83)
	AC	3456.0	2872.6	99.747	3490.8				
	YC		77.1	14.376					
GW	SC	3583.0	47.6	90.602	3324.3	2.398 (P = 4.76)	0.189	0.160	2.046 (P = 7.50)
	AC	3216.5	637.2	47.774					
	YC		63.0	44.506					

WW: Wastewater, GW: Groundwaters *a*, intercept; *b*(L mg<sup>-1</sup>), slope; *S<sub>y,x</sub>*, regression standard deviation; *b<sub>p</sub>*(L mg<sup>-1</sup>), pooled slope of SC and AC; *C<sub>SC</sub>*(mg L<sup>-1</sup>), sample analyte concentration from SC; *C<sub>AC</sub>*(mg L<sup>-1</sup>), sample analyte concentration from AC; *t<sub>calc</sub>*, statistic for slope and sample analyte concentrations, respectively; *p*(%), *p*-value for each *t*-test.

resolved from 6-C and 7-C isomers which elude together.

**Analytical Parameters**

Calibration graphs for aqueous samples treated according to the Sample treatment described above were made by using

the conditions described for every methodology in Chromatographic separation and detection. Linearity of the calibration graphs was tested according to the Analytical Methods Committee [14] using peak areas; the lack-of-fit test was applied to two replicates and two injections of each standard. The results for the intercept (*a*), slope (*b*), correlation

coefficient (*R*<sup>2</sup>) and probability level of the lack-of-fit test (*P<sub>lof</sub>*(%)) for total LAS and homologues are summarized in Table 2 and for isomers in Table 3. Thus, the data yield shows good linearity within the stated ranges.

The precision, determined as relative standard deviation (RSD), was measured for a concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> for

total LAS by performing ten independent determinations in every case.

The detection limit (DL) and quantification limit (QL) have been calculated from the blank standard deviation. The liquid chromatographic blanks have been estimated by applying the methodology proposed by Gonzalez-Casado et al. [15]. It can be assumed that the chromatographic peak shape is a Gaussian-type one, then the estimation of base width ( $W_b$ ) for 99.73% of the peak-area is  $W_b = 6\sigma = 2.548 W_{0.5h}$ , where  $W_{0.5h}$  is the half-width of the peak. Extrapolation of the graph of  $W_{0.5h}$  at different concentrations of analyte can give us an adequate statistically significant idea of the width of the base for "zero concentration". The blank signal for each analyte can be determined by integration over the baseline of the chromatograms taking a width  $t_R \pm 0.5W_{t0}$  where  $t_R$  is the retention time of the analyte and  $W_{t0}$  has been evaluated as explained above. It relies on studying the blank standard deviation in a time interval corresponding to the peak width at its base, extrapolated to zero concentration. Detection limits, which are better adjusted to a statistical evaluation, are implemented. Thus, DL and QL were calculated and the results obtained are also summarized in Tables 2 and 3 respectively. The values shown were calculated directly for the hydroalcoholic extracts (3:2 mL methanol:water) used to inject the sample in the chromatograph, without taking into consideration the initial volume of the water sample. For this reason if we start from 100 mL as we propose, the values for detection and quantification limits are 20 times smaller because the final volume of the extract is 5 mL.

#### Applications and Validation of the Methods

The proposed methods were applied to the determination of these compounds in wastewater from Granada and groundwater from a well in the aquifer of the fertile plain of Granada. The groundwater analysed prior to our deliberate spiking with the analytes are free of this contamination, while the wastewater samples were contaminated with LAS, for this reason the validation protocol was applied directly without spiking.

Validation of the proposed method was carried out by using Standard Addition Methodology [16]. Three experiments were required to obtain the data set necessary to apply the proposed statistical protocol. The following analytical procedure was applied: 1) Standard Calibration (SC) as described above; 2) Standard Addition Calibration (AC) obtained by spiking five samples with increasing volume of LAS standard solution and 3) Youden Calibration (YC) in which increasing amounts of sample are checked [17]. The parameters obtained from procedures 1), 2), and 3) are shown in Table 4 for total LAS and homologues and Table 5 for isomers.

The p-values calculated for the comparison of slopes through 1) and 2) are in all cases higher than 5% and consequently the slopes are similar. Furthermore, the p-values obtained for comparison of analyte contents (Tables 4,5) are in all cases higher than 5% too. For all these reasons, we conclude that the methods here proposed are accurate enough. Besides, the absence of an intercept in the Youden Calibration (YC) implies the absence of matrix effects.

#### Acknowledgements

The authors wish to express their thanks to the Spanish Ministry of Science and Technology (PPQ2003-07978-C02-01) for their financial support and to Petroquímica Española S.A. (PETRESA) for providing the standards of LAS homologues and their valuable contributions to this project.

#### References

- Cavalli L, Clerici R, Radici P, Valtorta L (1999) *Tenside Surfaccants Deterg* 36:254-258
- ECOSOL (European Center of Studies on LAB-LAS) Statistics, (2001) Brussels
- Vinther FP, Mortensen GK, Elsgaard L (2003) *Environ Toxicol Chem* 22:35-39
- Kohler HPE, Angst W, Giger W, Kutz C, Müller S, Suter MJF (1997) *Chimia* 51:947-951
- Matthijs E, De Henau H (1987) *Tenside Surfaccants Deterg* 24:193-198
- Heining K, Vogt C, Werner G (1996) *J Chromatogr A* 745:281-292
- León VM, Gonzalez-Mazo E, Gómez-Parra A (2000) *J Chromatogr A* 889:211-219
- Reiser R, Toljander HO, Giger W (1997) *Anal Chem* 69:4923-4930
- Ding WH, Lo JH, Tzing SH (1998) *J Chromatogr A* 818:270-279
- Ding WH, Fann JCH (2000) *Anal Chim Acta* 408:291-297
- Heining K, Vogt C, Werner G (1998) *Analyst* 123:349-353
- Riu J, Barceló D (2001) *Analyst* 126:825-828
- Nyíredy S, Meier B, Erdelmeier CAJ, Sticher O (1985) *J High Resolut Chromatogr* 8:186-191
- Analytical Methods Committee (1994) *Analyst* 119:2363-2366
- González-Casado A, Cuadros-Rodríguez L, Hernández EA, Vilchez JL (1996) *J Chromatogr A* 726:133-139
- Cuadros-Rodríguez L, García Campaña AM, Alés F, Jimenez C, Román M (1995) *J Assoc Off Anal Chem* 78:471-476
- Cardone MJ (1983) *J Assoc Off Anal Chem* 66:1283-1294

Anal Bioanal Chem  
DOI 10.1007/s00216-006-1069-y

ORIGINAL PAPER

## New sample treatment for determination of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in agricultural soils by liquid chromatography with fluorescence detection

M. Nimer · O. Ballesteros · A. Navalón · G. Crovetto ·  
C. Verge · I. López · J. L. Berna · J. L. Vilchez

Received: 30 September 2006 / Revised: 28 November 2006 / Accepted: 1 December 2006  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** A new sample-treatment procedure has been developed for determination of total linear alkylbenzene sulfonate (LAS), i.e. homologues and isomers, in agricultural soil. The procedure involves two steps, ultrasound-assisted extraction of LAS from the samples with methanol then clean-up of the methanolic extracts and preconcentration of the LAS by solid-phase extraction on two adsorbent cartridges (SAX and C<sub>18</sub>). The ultrasound-assisted procedure reduces extraction time (10 min in contrast with 6–12 h for conventional Soxhlet extraction) and requires only small volumes of organic solvent. The effect of different variables interacting in the ultrasound-assisted extraction process was studied. Finally, separation and quantification of the homologues and isomers of LAS was performed by liquid chromatography with fluorescence detection (LC–FD). 2-Octylbenzenesulfonic acid sodium salt (Na-2OC<sub>8</sub>-LAS) was used as internal standard. The proposed method was satisfactorily used for determination of LAS in agricultural soil samples from the fertile plain of Granada (Spain).

**Keywords** Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) · Ultrasound extraction · Liquid chromatography · Environmental analysis · Soil analysis

### Introduction

Linear alkylbenzene sulfonate (LAS), the most important class of anionic surfactant, is used mainly in domestic and industrial detergent formulations. It was introduced commercially in 1964 as a substitute for nonbiodegradable branched alkylbenzene sulfonates (ABS). Commercial LAS is a mixture of 20 different closely related isomers and homologues, each containing an aromatic ring sulfonated at the *para* position and attached to a linear alkyl chain which usually varies from 10 to 13 carbon atoms [1].

European production of LAS was 487 kton in 2004 [2]. Of this approximately 80% was used for detergents, which gives an idea of the amount of wastewater discharged into the environment with or without adequate disposal. LAS is always present in urban wastewater and is thus found in many different environmental compartments [3, 4]. This wastewater is occasionally treated, reducing thus the load of LAS in the environment, but LAS may be introduced as a contaminant in natural ecosystems by direct use of untreated wastewater as irrigation water and by use of sewage sludge as a fertilizer on agricultural soil [5]. LAS may also enter the soil as a result of the use of pesticides, because detergents are used as emulsifiers and as dispersing and spreading agents in pesticide formulations [6]. In the terrestrial environment LAS can be inhibitory to bacteria, fungi, and other inhabitants of the soil ecosystem [7–9]. Exposure of agricultural soil to LAS may therefore affect

M. Nimer · O. Ballesteros · A. Navalón · G. Crovetto ·  
J. L. Vilchez (✉)  
Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences,  
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences,  
University of Granada,  
Avda. Fuentenueva s/n,  
18071 Granada, Spain  
e-mail: jvilchez@ugr.es

C. Verge · I. López · J. L. Berna  
Petroquímica Española S.A. (PETRESA),  
Apartado 40, C. Puente Mayorga s/n,  
11360 San Roque, Cádiz, Spain

microbial activity, which is important for soil quality and nutrient cycling [10]. For these reasons, determination of LAS in environmental samples is of great interest.

During recent decades determination of LAS in different environmental samples has been extensively studied. Liquid chromatography (LC) using UV [11–15], fluorescence [12, 16–23], or mass spectrometric [24–27] detection can be regarded as routine methods for LAS analysis. Chromatographic analysis usually involves tedious sample treatment, however, to extract the compounds from a complex matrix, for example soil. Determination of LAS in soil requires many steps that involve solvent extraction and solid phase clean-up. Isolation of LAS from soil samples is accomplished by use of a variety of extraction procedures. Almost all traditional methods, e.g. Soxhlet [11, 16, 17, 24], reflux [12, 13], and shaking [18, 28] extraction consume much solvent and time.

New methods of sample treatment have been developed to reduce the volume of organic solvent used and the time needed for total extraction from this type of matrix. They are based on CO<sub>2</sub>-supercritical fluid extraction with methanol as organic modifier [19, 20], microwave-assisted extraction [21], and/or pressurized-liquid extraction [22, 25, 26], all of which require complex and expensive instrumentation.

Extraction assisted by ultrasound can be an advantageous alternative both to conventional extraction (Soxhlet) and, occasionally, novel extraction techniques, for example supercritical-fluid extraction (SFE) and microwave-assisted extraction [29]. Another advantage is that the equipment for ultrasonication is very simple, quickly effective, less expensive, and easy to operate [14, 15, 27, 30–33]. It is based on a sonochemical phenomenon associated with acoustic cavitation—the formation, growth, and implosive collapse of gas vacuoles in a solution. The collapse may proceed as an adiabatic compression and generate high temperature and pressure [34] and the implosion of cavities establishes an unusual environment for chemical reactions [35, 36]. As a result of the process of cavitation, ultrasonic radiation is a powerful tool for acceleration of different stages of the analytical process for solid [37] and liquid samples [38]. This type of energy can be used to facilitate and accelerate the pretreatment of solid samples, for example extraction of organic compounds [30], because sonication results in more efficient contact between solid and solvent.

The objective of this study was to develop a routine method for analysis of total LAS, i.e. homologues and isomers, in soil samples by using ultrasound-assisted extraction to reduce the total analysis time.

The proposed method has been satisfactorily applied to soil samples from twelve agricultural plots of the fertile plain of Granada (Spain).

## Experimental

### Chemical and reagents

All reagents were of analytical grade unless specified otherwise. Water was purified using a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Commercial LAS was kindly supplied by Petroquímica Española (Madrid, Spain) as an aqueous solution of the sodium salt with an LAS content of 44.05% (w/w). The average molecular weight of the Na-LAS was 342.2 g mol<sup>-1</sup> and the distribution of the linear alkyl chain homologues was C<sub>10</sub> 14.14%, C<sub>11</sub> 37.72%, C<sub>12</sub> 29.74%, and C<sub>13</sub> 23.40%. 2-Octylbenzenesulfonic acid sodium salt (Na-2OC<sub>8</sub>-LAS; 97.6%, w/w), used as an internal standard, was also supplied by Petroquímica Española.

Stock solutions of LAS and Na-2OC<sub>8</sub>-LAS (1.0 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared in methanol and stored at 4 °C in the dark. Both solutions were stable for six months. These solutions were used to spike the soil samples. All glassware was cleaned with chromic acid to minimize LAS contamination. Working standards were prepared just before use, LAS being diluted with methanol and Na-2OC<sub>8</sub>-LAS with deionised water.

Methanol (HPLC-gradient grade), *n*-hexane and formaldehyde were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dodecyl sulfate (SDS) and hydrochloric acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetonitrile (HPLC-gradient grade), sodium hydroxide, and phenolphthalein were supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

Solvents and aqueous solutions used were filtered through 0.45 µm Nylon membranes (Millipore).

Isolute C<sub>18</sub> (500 mg/3 mL) and Isolute SAX (500 mg/3 mL) solid-phase extraction (SPE) adsorbent cartridges were purchased from Isolute Sorbent Technologies (Mid Glamorgan, UK).

### Instrumentation

Ultrasonic irradiation was applied by means of a Digital Sonifier (20 kHz, 400 W), model S-450D, from Branson (Danbury, USA), equipped with an ultrasonic generator, a model 102 converter, standard 12.70-mm diameter titanium disruptor horn, flat and replaceable 12.70 mm diameter titanium tip, and temperature probe. The horn was immersed in a distilled water bath (1,500 mL). The container used as sonication bath was a stainless steel conical cylinder of height 13.50 cm, inferior base 12.00 cm I.D., superior base 15.00 cm I.D., wall thickness 0.20 cm and 1,750 mL capacity. The container had two lateral openings designed for circulation of the water to keep the temperature of the bath constant.

These openings were located in different regions, the inlet in the lower part and outlet in the upper part of the conical cylinder. Extraction flasks were placed in this container. These flasks were stainless-steel cylinders 10.1 cm long and 4 cm I.D. and were useful either for performing the extraction or for centrifugation. The energy of ultrasonic irradiation was fixed at the desired level by using a power setting in the 10–100% range. This sonifier has a digital display which provides a continuous read-out of the power (range 105–125 W in this work) delivered to the end of the tip.

A model Universal 32 centrifuge from Hettich (Tutlingen, Germany) and a model Frigomix U plus Thermomix 1441 thermostat from B. Braun (Melsungen, Germany) were also used.

SPE was performed on a Supelco (Madrid, Spain) vacuum manifold for twelve columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump. The polypropylene (3 mL) cartridges were attached to reservoirs with 60 mL capacity.

Analysis was performed with an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 1100 series high-performance liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, an on-line degasser, an autosampler, an automatic injector with a loop of up to 100  $\mu\text{L}$ , a thermostatted column compartment, and a fluorescence detector (flow-cell volume 8  $\mu\text{L}$ ) connected on-line. ChemStation for LC 3D software (Agilent) was used for instrument control and for data acquisition and analysis.

Compounds were separated on a 125 mm  $\times$  4 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  particle size, LiChrospher-100 RP-8 column with a 15 mm LiChrospher-100 RP-8 safeguard column and on two 250 mm  $\times$  4 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  particle size, LiChrospher-100 RP-18 columns, purchased from Merck.

Statgraphics software package [39] was used for statistical analysis of data.

#### Sample collection and preparation

Soil samples were collected from twelve plots on the fertile plain of Granada. The soil had not been sprayed with pesticides and herbicides for the last five years nor had it ever received sewage sludge. All the soil collected was from the arable layer. Soils were sampled by use of a soil drill. The samples were placed in plastic containers and conserved by immediate addition of 3% (*v/v*) formaldehyde. Sub-samples (200 g) of this mixture were dried at room temperature for 48 h. The dried samples were then ground with a mortar and pestle and passed through a 30-mesh sieve to enhance the extractability of the analyte. Soil samples were stored in the dark at 4  $^{\circ}\text{C}$  until analysis.

#### Preparation of spiked soil samples

Soil samples were accurately weighed and placed in stainless steel flasks. Spiked soil samples were prepared by addition of suitable volumes of LAS standard solution to 5.0 g of each sample. Methanol was then added until the solvent completely covered the soil particles. The suspension was thoroughly mixed for 1 min with a mechanical shaker to enable analyte distribution throughout the soil. The bulk of the solvent was slowly evaporated at room temperature over a period of 15–17 h and the spiked soils were then ready for the experiments.

#### Ultrasonic extraction procedure

The sonication bath was prepared by addition of distilled water (1,500 mL). Each phase of the extraction was performed using two metallic capsules within the sonication bath at the same time. Capsules containing the soil samples (5.0 g) and methanol (100 mL) were arranged in the bath so they were 2 cm apart and 2 cm from the probe tip (Fig. 1). The samples were ultrasonicated for 10 min with an amplitude of 75% and then immediately centrifuged at 4,000 rpm for 10 min. The soil residues were then washed with 30.0 mL methanol and centrifuged again, and the methanolic extracts were combined.

#### Solid-phase extraction procedure

Each methanolic extract was subjected to SPE on an Isolute SAX cartridge previously been activated with *n*-hexane (3 mL) and methanol (5 mL). The methanolic extracts

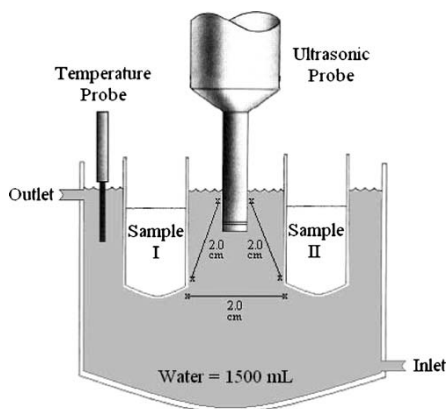


Fig. 1 Schematic diagram of ultrasound bath

(~130 mL) were passed through the cartridges at 2–3 mL min<sup>-1</sup>. Clean-up was performed using methanol (5 mL) and the analytes were then eluted with 2 mL methanol–water 3:2 (v/v) containing 4 mol L<sup>-1</sup> HCl into a 10-mL volumetric flask. The eluate was neutralised with 4 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution (using phenolphthalein as indicator) and, finally, the solution was diluted to volume with deionized water.

These 10-mL solutions were then passed through a Isolute C<sub>18</sub> cartridge previously preconditioned with methanol (5 mL) then deionised water (5 mL). The solution was passed through the cartridge at 2–3 mL min<sup>-1</sup>. Clean-up was performed with 3 mL methanol–water 35:65 (v/v) and the analytes were eluted with methanol (3 mL). The eluate was evaporated to dryness, by means of a stream of nitrogen at room temperature, and the residue was dissolved in 1 mL MeOH–H<sub>2</sub>O 3:2 (v/v) containing 2 µg mL<sup>-1</sup> Na-2OC<sub>8</sub>-LAS as internal standard.

#### Chromatographic analysis

The extract (100 µL) was injected into the chromatograph using experimental and instrumental conditions which depended on the resolution required for the analysis: total LAS, homologues, or isomers [23].

#### Determination of total LAS

Quantification of total LAS was achieved by assuming that total LAS was the sum of all the homologues present.

#### Determination of homologues

Analytical separation of the homologues was performed on a LiChrospher-100 RP-8 analytical column (125 mm × 4 mm I.D., 5 µm particle size) and a LiChrospher-100 RP-8 safeguard column (15 mm) with a mobile-phase gradient prepared from methanol (component A) and 30 mmol L<sup>-1</sup> SDS (component B). The initial conditions were 55% A and 45% B and the percentage of A was then increased linearly to 70% in 15 min and then returned to 55% in 1 min. The amount of B was then set at 45% for 5 min to restore the initial conditions. The total run time was 16 min and the post-delay time was 5 min. The mobile phase flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The column oven temperature was 40 °C and fluorescence measurements were performed with excitation and emission wavelengths of 230 and 290 nm, respectively, with a PMT gain of 13.

#### Determination of isomers

Resolution of the isomers was performed by use of two coupled LiChrospher-100 RP-18 columns (250 mm × 4 mm

I.D.; 5 µm particle size). The isomers were eluted with a flow rate gradient from 1.0 to 0.25 mL min<sup>-1</sup> and a linear mobile-phase gradient prepared from acetonitrile (component A) and 5 mmol L<sup>-1</sup> SDS (component B). The acetonitrile content was increased linearly from 20 to 40% in 160 min then returned to 20% A, with flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> in another 2 min. The composition was then set to 20% A for 10 min to restore the initial conditions.

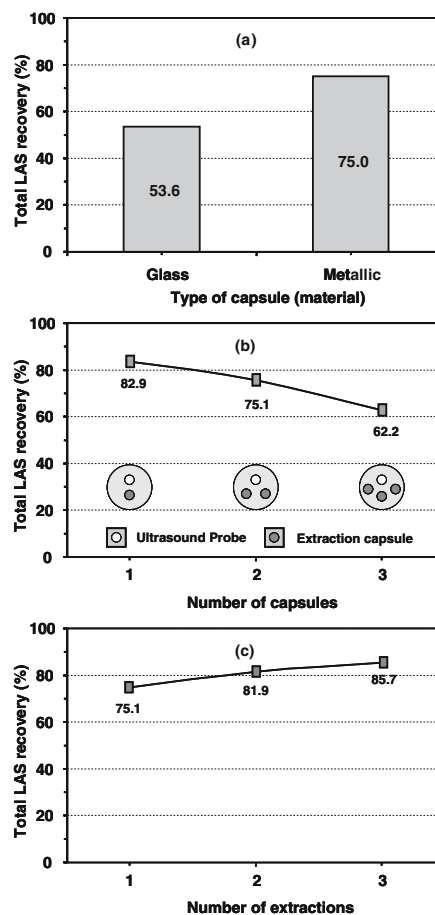


Fig. 2 Effect on the recovery of total LAS from spiked soil samples of: (a) use of different materials for manufacture of extraction capsules, (b) number of extraction capsules, and (c) the number of extractions



**Table 1** Conditions selected for the extraction and purification steps

Condition	Values studied	Value selected
Ultrasound extraction step		
Type of capsule	Glass/Metallic	Metallic
Number of capsules	1–3	2
Number of extractions	1–3	1
Volume of methanol (mL)	20–100	100
Time (min)	2–12	10
Amplitude (%)	10–90	75
SPE step		
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	1–4	2–3
[HCl] in methanol (mol L <sup>-1</sup> )	0–4	4

The total run time was 162 min and the post-delay time was 10 min. The columns were thermostatted at 40 °C and fluorescence measurements were performed with excitation and emission wavelengths of 230 and 308 nm, respectively, with PMT gain 13.

## Results and discussion

### Optimisation of ultrasonic extraction

In ultrasound-assisted extraction there are many possibilities of interference between the different conditions. It is, therefore, fundamental to know the most favourable conditions for effective and reproducible extraction. Conditions that can alter the process of extraction are:

1. the liquid used for propagation of the ultrasound wave;
2. the quantity of liquid in the bath;
3. the viscosity of the liquid;
4. the bath temperature;

5. the geometric form of the bath containing the ultrasonic probe;
6. the geometric shape of the extraction capsule;
7. the material used to construct the capsule used for extraction; and
8. the distance between the ultrasonic probe tip and the extraction capsule.

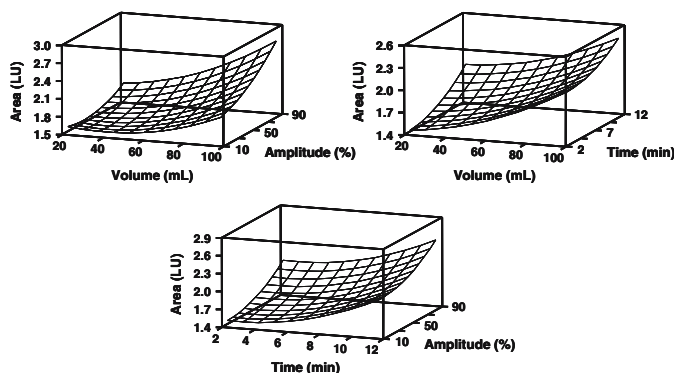
It was stipulated that the initial conditions used for the extractions would be:

1. use of deionized water (volume 1,500 mL) as propagation medium for the ultrasound radiation;
2. temperature of the bath to be kept constant at 25±0.5 °C by use of a cryostat, to reduce evaporation of the organic solvent; and
3. ultrasonic probe always located on the bath as described in the [Instrumentation](#) section.

Water, methanol, ethanol, and some water–alcohol mixtures were investigated as extraction solvents. The best results were obtained with methanol.

With these pre-established conditions we proceeded to study the extraction. Conditions significantly affecting the process would enlighten us about procedures resulting in more efficient extraction. In the first set of experiments the type of extraction capsule (metal capsule, 10.1 cm×4.0 cm I.D. with 100 mL capacity or glass capsule, 10.5 cm×3.5 cm I.D. with 100 mL capacity), the number of capsules in the bath (1 to 3), and the number of simultaneous extractions (1 to 3) in the bath were studied individually. For this purpose weighed soil (5.0 g) was spiked with 20 mg kg<sup>-1</sup> total LAS and sonicated for 10 min (amplitude 75%) with 100 mL methanol. The first experiment was to evaluate the types of extraction capsule while performing only one extraction step by sonication. The mixtures were centri-

**Fig. 3** Response surface of the experimental design



fused at 4,000 rpm for 10 min, the residual soil was washed with 30 mL methanol and centrifuged again. Finally, the methanolic extracts were combined. The SPE procedure mentioned above was then applied before chromatographic separation of the homologues. The purpose of this analysis was to determine the effect on performance of diffusion and propagation of the ultrasonic wave and, therefore, which arrangement of the capsules enhanced the efficiency of the extraction. From the results obtained the capsule chosen for subsequent analysis was the metal one, because it resulted in better recoveries. These results are shown in Fig. 2a.

We then determined the best number of capsules in the sonication bath. In this experiment extraction was per-

formed with 1 to 3 extraction capsules instead of the customary two or three; the results can be seen in Fig. 2b. Too many capsules in the bath results in reflections of the ultrasound waves, which reduced the efficiency of the sonication process. We therefore decided that extraction would be performed with two capsules.

We then determined the number of extractions necessary. Extraction was repeated up to three times, the amount of LAS extracted was determined each time, and the cumulative recovery was calculated (Fig. 2c).

A Central Composite Design (CCD) was used to study the combined effect of sonication time, extractant volume, and amplitude of ultrasound radiation on the extraction process. It involved the use of three centre points to

**Table 2** Comparison of the different methods for extraction of LAS from samples

Analysis	Sample	Extraction method <sup>a</sup>	Time	Ref
Total LAS, homologues and isomers	River sediment	SOX (200 mL, MeOH+20% (w/w) solid NaOH)	12 h	[11]
Total LAS and homologues	Marine sediment	PLE (MeOH)	15 min	[24]
Total LAS and homologues	Agricultural soil	SOX (MeOH)	5 h	
Total LAS and homologues	Agricultural soil	SOX (80 mL, MeOH)	8 h	[16]
Total LAS and homologues	River sediment	SOX (100 mL, H <sub>2</sub> O)	24 h	[17]
Total LAS and homologues	River sediment	SOX (100 mL, MeOH)	24 h	
Total LAS and homologues	River sediment, sewage sludge, sludge amended soil	SOX+MAE (100 mL, H <sub>2</sub> O)	2 h	
Total LAS and homologues	River sediment, sewage sludge, sludge amended soil	REF (150 mL, MeOH)	2 h	[12]
Total LAS and homologues	Sewage sludge, sludge-amended soil	REF (50 mL, 0.5 mol L <sup>-1</sup> KOH in MeOH)	4 h	[13]
Total LAS, homologues and isomers	River sediment	SHE (MeOH)	24 h	[28]
Total LAS and homologues	Agricultural soil	SHE (30 mL, MeOH)	(×3) 1 h	[18]
Total LAS and homologues	Sludge-amended soil, river sediment, digester sludge	SFE (MeOH modified CO <sub>2</sub> )	30 min	[19]
Total LAS and homologues	River sediment	SFE (H <sub>2</sub> O)	50 min	[20]
Total LAS and homologues	Preserved natural soil, Agricultural soil, Sludge amended soil, Sewage sludge	MAE (60 mL, MeOH)	50 min	[21]
Total LAS and homologues	Sludge-amended soil	PLE (MeOH+H <sub>2</sub> O, 9:1 v/v)	(×2) 15 min	[25]
Total LAS and homologues	Marine sediment	PLE (ACT+MeOH, 1:1 v/v)	15 min	[26]
Total LAS and homologues	River sediment	PLE (MeOH)	45 min	[22]
Total LAS and homologues	Sludge-amended soil	USE (60 mL, MeOH+H <sub>2</sub> O, 1:1 v/v, bath)	20 min	[29]
Total LAS and homologues	Lagoon sediment	USE (70 mL, EtOH+H <sub>2</sub> O, 1:1 v/v, bath)	(×3) 15 min	[27]
Total LAS and homologues	Agricultural soil	USE (MeOH, bath)	1 h	[14]
Total LAS, homologues and isomers	Agricultural soil	USE (100 mL, MeOH, probe)	10 min	This work

<sup>a</sup> REF: reflux; SOX: Soxhlet; MAE: microwave-assisted extraction; PLE: pressurized liquid extraction; SFE: supercritical-fluid extraction; SHE: shaking extraction; USE: ultrasound extraction; MeOH: methanol; ACT: acetone; EtOH: ethanol.

evaluate experimental error. The experimental design and statistical analysis were performed using the Statgraphics software. The sum of the peak areas of the homologues was used as the response variable. Table 1 shows the upper and lower values used for each factor for accurately weighed soil (5 g) spiked with 20 mg kg<sup>-1</sup> total LAS. By use of the standardized Pareto chart all the variables (ultrasound radiation amplitude, sonication time, and extractant volume) are found to be statistically significant factors in the ranges under study. The values selected for amplitude and sonication time were a compromise between reasonable recovery, reasonable analysis time, and smaller consumption of the horn tip rather than the optimum values found. The choice was inferred from predictions provided by the Statgraphics software. The maximum volume of extractant was selected as the optimum. The values selected, on the basis of results obtained by use of the response surface (Fig. 3), are listed in Table 1.

Table 2 show the times required for extraction of LAS from soils, as estimated by eighteen different authors, including ourselves. Our extraction times results are much shorter than those reported by other authors.

#### Solid-phase extraction

Because of the complex nature of soil a solid-phase extraction procedure was selected as appropriate for clean-

up and preconcentration of LAS in the methanol extracts obtained previously. This procedure was performed in two stages. In the first stage, with SAX cartridges, two conditions were optimized—flow rate (which affects analyte adsorption) and the concentration of eluent used (which affects analyte desorption). The optimum concentration of HCl in the water-methanol solution used to desorb the LAS from the SAX phase was tested by use of different concentrations (0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 and 4.00 mol L<sup>-1</sup>). Maximum analyte peak area was obtained by use of 4.00 mol L<sup>-1</sup>, which was therefore selected for subsequent experiments. Another factor studied was the flow rate used for both adsorption and desorption (1.0, 2.0, 4.0, and >4.0 mL min<sup>-1</sup>). The results obtained showed that retention of the analytes was maximum if the flow rate was slightly less than 4.0 mL min<sup>-1</sup>; subsequent experiments were performed at a flow rate of 2.0–3.0 mL min<sup>-1</sup>. The second stage of SPE (with C<sub>18</sub> cartridges) was used because of the recommendations by del Olmo et al. [23]. This stage was necessary to remove substances coeluted with the SAX, because the solution contained not only phenolphthalein but excess chloride. Breakthrough curves were evaluated for LAS to establish the capacity of the adsorbents used (SAX and C<sub>18</sub>). Curves were recorded using a solution of 10 mg L<sup>-1</sup> total LAS in Milli-Q water at a flow rate of 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Breakthrough volumes of LAS

**Table 3** Analytical and statistical data

Parameter <sup>a</sup>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	Total LAS
<i>a</i>	-0.12 × 10 <sup>-3</sup>	2.11 × 10 <sup>-3</sup>	7.69 × 10 <sup>-3</sup>	4.67 × 10 <sup>-3</sup>	
<i>S<sub>a</sub></i>	0.64 × 10 <sup>-3</sup>	1.89 × 10 <sup>-3</sup>	1.33 × 10 <sup>-3</sup>	1.0 × 10 <sup>-3</sup>	
<i>b</i> (kg mg <sup>-1</sup> )	0.484	0.484	0.484	0.484	
<i>S<sub>b</sub></i>	0.17 × 10 <sup>-3</sup>	0.21 × 10 <sup>-3</sup>	0.21 × 10 <sup>-3</sup>	0.19 × 10 <sup>-3</sup>	
LDR (mg kg <sup>-1</sup> )	0.06–7.07	0.17–16.36	0.15–14.87	0.11–11.70	
<i>R</i> <sup>2</sup> (%)	99.99	99.99	99.99	99.99	
<i>S<sub>y/x</sub></i>	2.90 × 10 <sup>-3</sup>	8.42 × 10 <sup>-3</sup>	6.29 × 10 <sup>-3</sup>	5.12 × 10 <sup>-3</sup>	
<i>P<sub>tot</sub></i> (%)	31.6	22.6	32.2	50.8	
LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	0.02	0.05	0.04	0.03	
LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )	0.06	0.17	0.13	0.10	
<i>R</i> (%)	75.1	75.2	75.2	75.0	
Accuracy (%) <sup>b</sup>					
Intra-day ( <i>n</i> =12)	96.6–104.4	97.3–103.3	98.3–102.6	96.6–101.7	97.4–102.2
Inter-day ( <i>n</i> =36)	99.3	99.1	100.1	99.2	99.6
Precision (RSD, %) <sup>b</sup>					
Intra-day ( <i>n</i> =12)	1.1–1.9	1.6–2.3	1.5–2.0	1.6–2.2	1.0–1.7
Inter-day ( <i>n</i> =36)	1.7	2.0	1.8	1.9	1.3

Accuracy and precision data of LAS homologues studied

<sup>a</sup> *a*, intercept; *S<sub>a</sub>*, intercept standard deviation; *b*, slope; *S<sub>b</sub>*, slope standard deviation; LDR, linear dynamic range; *R*<sup>2</sup>, determination coefficient; *S<sub>y/x</sub>*, regression standard deviation; *P<sub>tot</sub>*, P-value for *lack-of-fit* test; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; *R*, average recovery obtained for 1.0, 5.0, 30.0, and 50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS and three determinations; RSD, relative standard deviation

<sup>b</sup> Average results obtained from three determinations of 1.0, 5.0, 30.0, and 50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS; measurements on days 1–3 (*n*=12 for each day)

under these conditions were >1 L for SAX and 76 mL for C<sub>18</sub>. The values used in this work were within these limits.

Recovery of this step (SAX and C<sub>18</sub>) was tested and the result was 97% for 1.0–50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS.

The variables studied and their values selected are listed in Table 1.

Analytical data and validation of the method

Calibration plots were established by use of standard soil samples spiked at eight concentrations (1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 35.0, and 50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS) and treated in accordance with the sample-treatment procedure described above. Each level was prepared by triplicate, and each calibration sample was analysed twice). Analyte-to-internal standard peak-area ratio was plotted against analyte concentration. The linearity of the calibration plots was tested by use of the Analytical Methods Committee [40] *lack-of-fit* test. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for the different homologues of LAS were calculated by use of the IUPAC criterion [41].

Analytical and statistical data for each homologue studied are summarized in Table 3.

To evaluate the precision of the assay, laboratory reproducibility and repeatability were estimated at four different concentrations, 1.0, 5.0, 30.0, and 50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS. The soil samples were spiked, extracted, and analysed in triplicate. The procedure was repeated three times on the same day to evaluate intra-day variability and was repeated on three consecutive days to determine inter-day variability. The repeatability and within-laboratory reproducibility, expressed as relative standard deviation (RSD), are summarized in Table 3.

Accuracy was evaluated by determining the recovery of known amounts of LAS in soil samples. Soil samples were spiked at 1.0, 5.0, 30.0, and 50.0 mg kg<sup>-1</sup> total LAS. Recovery was evaluated by comparing the result from the spiked soil with a soil submitted to the same process of extraction and fortification before being analyzed by the chromatographic method for the homologues. The experiment was performed in triplicate. Average recovery of the LAS homologues, with the standard deviations, are listed in Table 3.

Application of the method

The method was used for determination of total LAS, homologues, and isomers in agricultural soil samples. Samples were collected from twelve plots at different locations on the fertile plain of Granada (commonly known as “Vega de Granada”): “Belicena” (four samples); “Churriana de la Vega” (two samples), “Granada” (one sample) and

Table 4 Total concentrations LAS found in the soils samples analyzed, and the proportion of each isomer as a percentage

Agricultural soil samples	Total (mg kg <sup>-1</sup> )																
	C <sub>10</sub>			C <sub>11</sub>			C <sub>12</sub>			C <sub>13</sub>							
	20	30	40	50	20	30	40	5+60	20	30	40	5+60	20	30	40	5+6+70	
Plot 1 - Belicena	0.352	1.57	1.79	2.03	2.35	3.08	4.20	8.30	11.69	3.66	4.72	5.79	13.75	4.15	4.89	6.86	21.18
Plot 2 - Belicena	0.602	0.77	1.03	1.10	1.42	3.11	4.79	8.25	12.78	3.00	5.48	9.45	15.78	2.91	5.30	5.92	18.91
Plot 3 - Belicena	0.405	1.87	2.29	2.46	3.00	3.08	5.27	7.81	15.29	3.86	5.51	6.51	16.49	2.94	4.34	7.77	11.56
Plot 4 - Belicena	0.302	1.49	1.58	1.97	2.28	3.21	4.90	7.25	12.65	3.65	4.59	8.94	16.77	3.51	4.86	7.47	14.87
Plot 5 - Granada	0.599	2.18	2.37	2.50	2.63	4.84	5.98	7.30	10.74	2.62	5.22	7.66	15.43	3.37	5.17	6.89	15.10
Plot 6 - Churriana de la Vega	0.297	2.29	2.46	2.84	3.11	3.12	5.07	7.56	14.65	3.88	4.72	9.39	14.80	3.27	5.15	8.55	9.16
Plot 7 - Churriana de la Vega	0.326	1.48	1.59	1.71	2.17	2.91	4.38	5.48	15.09	2.27	6.86	11.52	14.57	4.86	5.87	7.77	11.46
Plot 8 - Las Gabias	0.266	2.02	2.19	2.51	2.87	4.99	6.81	8.26	9.20	5.51	7.68	9.21	11.68	4.08	5.01	7.15	10.86
Plot 9 - Las Gabias	0.325	1.97	2.68	2.64	2.77	3.04	4.77	9.76	14.73	3.26	7.01	10.29	13.47	3.21	4.27	5.81	10.33
Plot 10 - Las Gabias	0.356	1.90	2.24	2.49	2.58	3.47	6.53	8.51	11.26	3.08	6.94	10.37	14.02	4.12	5.02	6.61	10.86
Plot 11 - Las Gabias	0.331	1.82	2.13	2.26	2.40	4.53	5.50	7.83	9.57	4.30	6.41	8.12	11.46	4.60	6.15	10.23	12.61
Plot 12 - Las Gabias	0.351	1.73	1.92	2.12	2.59	3.67	5.01	8.25	11.18	1.99	5.58	9.22	15.85	4.35	5.82	8.83	11.89
Alkyl chain distribution of commercial product	2.66	2.94	3.63	4.91	5.04	5.67	7.23	14.78	3.92	4.65	5.79	15.58	2.77	3.19	4.06	13.58	

“Las Gabias” (five samples). To determine LAS in these soils, the samples were processed by triplicate and each experimental point was analyzed twice.

The total amounts of LAS found in the soil samples and the proportion of each isomer as a percentage are summarised in Table 4. Figure 4 shows typical chromatograms obtained using the optimised chromatographic conditions for determination of the LAS homologues (A) and isomers (B).

Changes in distribution of the components of LAS have been demonstrated in previous work [42, 43]. This shift was explained in terms of different adsorption of the different components of the LAS—those with longer alkyl chain would be more strongly adsorbed by the organic fraction of the soil [44].

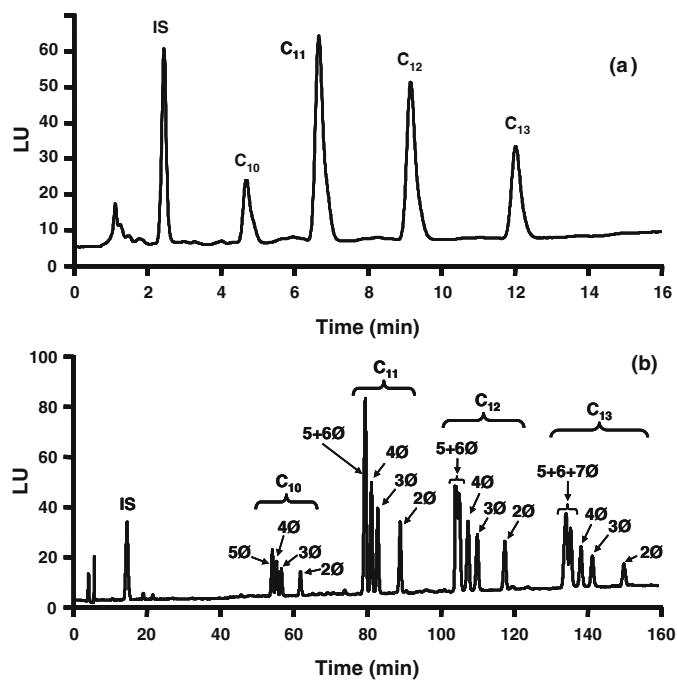
LAS was detected at low levels, approximately  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , in all the soils analyzed. The presence of the LAS could be because these agricultural soils were in contact with the analyte because of the possible exposure to wastewater, pesticides, or sludge. According to a European Commission Technical Guidance Document [45] these low

levels of LAS are not believed to be a ecotoxicological hazard.

### Conclusions

A simple, rapid, and practical method has been developed for determination of total LAS, homologues and isomers in agricultural soil. The approach is based on ultrasound-assisted extraction in conjunction with solid-phase extraction and then analysis by liquid chromatography with fluorescence detection. The effect of different ultrasound extraction conditions on recovery of the LAS was studied. The main advantages of the method are the low extraction times (10 min), low volumes of organic solvent used, and good reproducibility. A field study conducted on the fertile plain of Granada (Spain) detected the presence of small amounts of LAS in a series of soil samples. The findings suggest agricultural practices in the area may need to be checked.

**Fig. 4** Chromatographic separation of homologues (a) and isomers (b) of LAS at  $5.0 \text{ mg kg}^{-1}$



**Acknowledgements** This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT) (Project No. PPQ2003-07978-C02-01) and by the Spanish Interministerial Commission of Science and Technology (CICYT) in its "Juan de la Cierva" program.

## References

1. Cavalli L, Clerici R, Radici P, Valtorta L (1999) *Tenside Surfact Det* 36:254–258
2. CESIO. General Assembly, September 2006, Santiago de Compostela, Spain
3. Waters J, Garrigan JT (1983) *Water Res* 17:1709–1715
4. Kikuchi M, Tokal A, Hoshida T (1986) *Water Res* 20:643–650
5. Holt MS, Matthijs E, Waters J (1989) *Water Res* 23:749–759
6. Jensen J (1999) *Sci Total Environ* 226:93–111
7. Holmstrup M, Krogh PH (1996) *Environ Toxicol Chem* 15:1745–1748
8. Wilke BM (1997) *Adv GeoEcol* 30:117–132
9. Hartmann L (1996) *Bull Environ Contam Toxicol* 1:219–224
10. Turco RF, Kennedy AC, Jawson MD (1994) In: Doran J-W, Coleman D-C, Bezdicsek D-F, Stewart B-A (eds) *Microbial indicators of soil quality - defining soil quality for a sustainable environment*, chap 5. American Society of Agronomy, Madison, USA, pp 73–90
11. Akyüz M, Roberts DJ (2002) *Turk J Chem* 26:669–679
12. Comellas L, Portillo JL, Vaquero MT (1993) *J Chromatogr A* 657:25–31
13. Matthijs E, de Henau H (1987) *Tenside Surfact Det* 24:193–199
14. Sarrazin L, Diana C, Wafo E, Rebouillon P (2003) *Int J Environ Stud* 60:229–240
15. Ou ZQ, Jia LQ, He YW, Sun TH, Shang DS (1996) *Chin J Ecol* 15:67–71
16. Elsgaard L, Pojana G, Miraval T, Eriksen J, Marcomini A (2003) *Chemosphere* 50:929–937
17. Morales-Muñoz S, Luque-García JL, Luque de Castro MD (2004) *J Chromatogr A* 1026:41–46
18. Vinther FP, Mortensen GK, Elsgaard L (2003) *Environ Toxicol Chem* 22:35–39
19. Priego-López E, Luque de Castro MD (2004) *Anal Chim Acta* 511:249–254
20. Hawthorne SB, Miller DJ, Walker DD, Whittington DE, Moore BL (1991) *J Chromatogr A* 541:185–194
21. Carlsen L, Kjelsmark J, Volting MB (2000) *Research notes from NERI*, no 134. National Environmental Research Institute, Roskilde, p 28
22. Kreisselmeier A, Dürbeck HW (1997) *J Chromatogr A* 775:187–196
23. del Olmo M, Garballo A, Nimer M, López I, de Ferrer JA, Vilchez JL (2004) *Chromatographia* 60:157–164
24. Lara-Martín PA, Gómez-Parra A, González-Mazo E (2006) *J Chromatogr A* 1112:205–210
25. Eichhorn P, López O, Barceló D (2005) *J Chromatogr A* 1067:171–179
26. González S, Petrovic M, Barceló D (2004) *J Chromatogr A* 1052:111–120
27. Andreu V, Rubio JL, Picó Y (2004) Presented at ISCO 2004, 13th Int Soil Conservation Conf, Brisbane, Australia
28. Tabor CF, Barber LB (1995) *Environ Sci Technol* 30:161–171
29. Luque-García JL, Luque de Castro MD (2003) *Trends Anal Chem* 22:41–47
30. Gómez-Ariza JL, Morales E, Beltrán R, Giraldes I, Ruiz-Benitez M (1995) *Analyst* 120:1171–1174
31. Hechler U, Fischer J, Plagemann S (1995) *Fresenius J Anal Chem* 351:591–592
32. Mecozzi M, Amici M, Pietrantonio E (1996) *Anal Commun* 33:303–305
33. Brilis GM, Mariden PL (1990) *Chemosphere* 21:91–98
34. Mizukoshi Y, Nakamura H, Bandow H, Maeda, Y Nagata Y (1999) *Ultrason Sonochem* 6:203–209
35. Suslick KS (1989) *Sci Am* 260:80–86
36. Carvallo LRF, Souza SR, Martinis BS, Korn M (1995) *Anal Chim Acta* 317:171–179
37. Luque-García JL, Luque de Castro MD (2002) *Analyst* 127:1115–1120
38. Priego-López E, Luque de Castro MD (2003) *Chromatographia* 57:513–518
39. Statgraphics (2000) version Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation and Manugistics Inc., Rockville, MA, USA
40. Analytical Methods Committee (1994) *Analyst* 119:2363–2366
41. Currie LA (1999) *Anal Chim Acta* 391:105–126
42. Mortensen GK, Egsgaard H, Ambus P, Jensen ES, Gron C (2001) *J Environ Qual* 30:1266–1270
43. Kuchler T, Kujawa M (1998) *Tenside Surfact Det* 35:476–479
44. Westall JC, Chen H, Zhang W, Brownawell BJ (1999) *Environ Sci Technol* 33:3110–3118
45. European Commission (1996) Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances, Part II: environmental risk assessment

*Anexos: Abreviaturas y acrónimos*

---

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>BAB</b>	Alquilbenceno ramificado
<b>BABS</b>	Sulfonato de alquilbenceno ramificado
<b>BrCP</b>	Bromuro de cetilpiridinio
<b>BrHTA</b>	Bromuro de hexadecil trimetil amonio
<b>CE</b>	Electroforesis Capilar
<b>CMC</b>	Concentración Micelar Crítica
<b>C<sub>A</sub></b>	Calibrado con adición patrón
<b>C<sub>p</sub></b>	Calor específico a presión constante
<b>C<sub>p</sub></b>	Calibrado con patrones
<b>C<sub>t</sub></b>	Masa de soluto por unidad de volumen de suelo
<b>C<sub>Y</sub></b>	Calibrado de Youden
<b>D</b>	Coefficiente de dispersión hidrodinámica
<b>DATS</b>	Sulfonatos de dialquiltetralina
<b>DER</b>	Desviación Estándar Relativa
<b>DSR</b>	Diseño de Superficie de Repuesta
<b>D<sub>h</sub></b>	Coefficiente de difusión en el medio poroso
<b>D<sub>m</sub></b>	Coefficiente de dispersión mecánica
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>ENV +</b>	Adsorbente para <i>SPE</i> compuesto por un polímero (poliestireno-divilbenceno)
<b>FFR</b>	Reactores de sulfonación en película
<b>FID</b>	Detector de Ionización de Llama
<b>FLD</b>	Detector de Fluorescencia

---

*Anexos: Abreviaturas y acrónimos*

---

<b>G</b>	Consumo (transformación o degradación) de soluto
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases
<b>GCB</b>	Adsorbente para <i>SPE</i> compuesto por carbón grafitizado desactivado (intercambio aniónico e hidrofóbico)
<b>HLAS</b>	Ácido sulfónico del <i>LAS</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b><math>h_{0.5}</math></b>	Mitad de la altura del pico gaussiano
<b>I</b>	Intensidad
<b>J</b>	Flujo de masa total del soluto por unidad de superficie y por unidad de tiempo
<b><math>J_c</math></b>	Flujo convectivo
<b><math>J_d</math></b>	Flujo de difusión
<b><math>J_m</math></b>	Flujo másico
<b>K</b>	Constante de degradación
<b><math>K_l</math></b>	Constante de adsorción de Langmuir
<b><math>K_d</math></b>	Constante de adsorción suelo-agua
<b><math>K_f</math></b>	Constante de adsorción de Freundlich
<b><math>K_{oc}</math></b>	Constante de adsorción normalizada respecto al contenido de carbono orgánico
<b><math>K_{ow}</math></b>	Coefficiente de partición en octanol-agua
<b>LAB</b>	Alquilbenceno lineal
<b>LAS</b>	Sulfonato de alquilbenceno lineal
<b>LD</b>	Límite de Detección
<b>LIN</b>	Linealidad
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido
<b>LOAEL</b>	Menor dosis/concentración en la que haya efecto adverso
<b>LQ</b>	Límite de Cuantificación

---



*Anexos: Abreviaturas y acrónimos*

---

<b>MBAS</b>	Sustancias activas con el azul de metileno
<b>MetOH</b>	Metanol
<b>m<sub>L</sub></b>	Constante empírica de saturación
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MOE</b>	Margen de Exposición
<b>MS</b>	Detector de Espectrometría de Masas
<b>NOAEL</b>	Máxima dosis/concentración de exposición experimental probada al cual no se observan efectos tóxicos
<b>NP</b>	Nonifenol
<b>NPEO</b>	Nonifenol etoxilado
<b>NTA</b>	Nitrilo acetato de sodio
<b>OCIs</b>	Organoclorados
<b>OECD</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
<b>OP</b>	Octilfenol
<b>OPEO</b>	Octilfenol etoxilado
<b>PAN</b>	1-(2-piridilazo)-2-naftol
<b>P<sub>e</sub></b>	Módulo adimensional de Peclet
<b>P<sub>h</sub></b>	Presión hidrostática
<b>PEC</b>	Concentración previsible en el medio ambiente
<b>PNEC</b>	Concentración máxima esperada que no produzca ningún efecto
<b>PETRESA</b>	Petroquímica Española Sociedad Anónima
<b>PS-DVB</b>	Adsorbente para <i>SPE</i> compuesto por un polímero (poliestireno-divilbenceno)
<b>PVDF</b>	Difluoruro de Polivinilidina
<b>q</b>	Concentración adsorbida
<b>Q</b>	Caudal del influente

---

*Anexos: Abreviaturas y acrónimos*

---

<b>rolling up</b>	Mecanismo de eliminación de mancha aceitosa o sólida del tejido por un tensioactivo
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>R<sub>s</sub></b>	Resolución
<b>SAS</b>	Sulfonatos de parafinas
<b>SPC</b>	Sulfofenil Carboxilatos
<b>SAX</b>	Adsorbente para <i>SPE</i> con intercambio aniónico compuesto por una amina cuaternaria
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>Sep-Pak plus PS-2</b>	Adsorbente para <i>SPE</i> compuesto por un polímero (poliestireno-divilbenceno)
<b>SFE</b>	Extracción por Fluido Supercrítico
<b>SIM</b>	Monitoración de Ion Seleccionado
<b>SPE</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>STP</b>	Tripolifosfato sódico
<b>S<sub>analítica</sub></b>	Sensibilidad o Resolución analítica
<b>S<sub>y/x</sub></b>	Desviación estándar de la regresión
<b>TBA</b>	Tetrabutilamonio hidrogeno sulfato
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TTEA</b>	Tetraetilamonio hidrogeno sulfato
<b>TFMPA</b>	Hidróxido de trimetilfenilamonio
<b>TMA</b>	Tetrametilamonio hidrogeno sulfato
<b>TMPA</b>	Hidróxido de (trifluorometil) fenilamonio
<b>u</b>	Velocidad intersticial de flujo
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UOP</b>	<i>Universal Oil Products</i>

---

Anexos: Abreviaturas y acrónimos

---

$W_{0.5h}$	Anchura a mitad del pico
<b>XAD-resinas</b>	Resinas poliméricas de amberlita usadas para la <i>SPE</i>
<b>XDB</b>	Proceso de inactivación de los grupos silanoles libres de fase ligada en columnas cromatográficas (del inglés, eXtra Densely Bonded)
<b>ZNS</b>	Zona no saturada
$\alpha$	Coefficiente de transferencia de materia entre la región móvil e inmóvil
$\alpha'$	Coefficiente de absorción
$\alpha_2$	Coefficiente cinético de primer orden
$\beta$	Coefficiente de partición
$\emptyset$	Radical fenilo
$\gamma$	Capacidad calorífica
$\eta_b$	Viscosidad de la cavidad
$\eta_s$	Fuerza de corte
$\kappa'$	Conductividad térmica del medio
$\lambda$	Longitud de onda
$\theta$	Porosidad del suelo
$\rho$	Densidad del medio
$1/n$	Exponente de Freundlich

---