

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS
ANIÓNICOS EN MATRICES AMBIENTALES.
COMPORTAMIENTO DEL JABÓN EN UNA
PARCELA AGRÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

ANTONIO SAMUEL CANTARERO MALAGÓN
GRANADA, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio Samuel Cantaro Malagón
D.L.: GR 2386-2010
ISBN: 978-84-693-1319-0

**DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS
ANIÓNICOS EN MATRICES AMBIENTALES:
COMPORTAMIENTO DEL JABÓN EN UNA
PARCELA AGRÍCOLA**

por

ANTONIO SAMUEL CANTARERO MALAGÓN

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor Europeo en
Química por la Universidad de
Granada.**

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

**VISADA en Granada a 11 de Enero
de 2010.**

**Fdo. Dr. Alberto Navalón Montón
Catedrático del Departamento de
Química Analítica de la Universidad
de Granada.**

**Fdo. A. Samuel Cantarero Malagón
Licenciado en Química.**

**Fdo. Dr. Oscar Ballesteros García
Profesor Titular del Departamento
de Química Analítica de la
Universidad de Granada.**

A mis padres, Ana y Francisco,

A mi sobrina y ahijada Alba.



AGRADECIMIENTOS



Durante estos últimos años, muchas son las personas que de manera directa o indirecta han contribuido en el desarrollo de la presente Tesis, y que llegado este momento, es justo recordar, en unas breves líneas, su inestimable, y casi siempre desinteresada, ayuda.

Quiero expresar, en primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis directores: el Dr. D. José Luis Vílchez Quero, el Dr. D. Alberto Navalón Montón y el Dr. D. Óscar Ballesteros García, por su dedicación y su constancia, las cuales fueron imprescindibles para la consecución de la presente Memoria.

A todo el personal de Cepsa Química S.A., Puente Mayorga, antiguamente llamada Petresa S.A., muy especialmente al personal del laboratorio: Ignacio, César, Coral, Juan, Carlos, José Luis Almeida, José Luis Berna, Paco, Esaú y al resto de compañeros, por su acogida, su apoyo, sus consejos, su amistad, que han sido y son parte fundamentalmente no sólo de la presente Tesis, sino de mi crecimiento personal y profesional. Al principio solamente fueron compañeros o tutores, pero con el paso del tiempo, y tras tres años repletos de anécdotas y vivencias, se han convertido en amigos y colegas, a los que siempre guardaré una profunda admiración y respeto.

A mis compañeros del grupo FQM-338 del Departamento de Química Analítica, sobre todo a Bartolomé, Marcio, Inma, Jalila, Alberto, Ana y Karim. Sin olvidar las caras nuevas como: Fernando, Esther, Noemí y Arno, o la estancia breve pero intensa de Pedro de Guatemala. A todos, gracias por vuestro ánimo.

Agradecimientos

Al Dr.D. Guillermo Crovetto y al Dr. D. Cristóbal Valenzuela, sin olvidar a Bartolomé y a Inocencio, por su esencial contribución en el desarrollo del estudio de campo de la presente Tesis.

A los profesores Dr.D. Marco P. Seabra Dos Reis y Dr. D. Pedro Manuel Saraiva de la Universidad de Coimbra y al profesor Dr. D. José Carlos Marques de la Universidad de Madeira, por hacer posible mi inolvidable estancia europea en Coimbra. Agradezco no sólo los conocimientos adquiridos, sino también la amabilidad y la hospitalidad mostrada por todos los miembros del grupo de investigación, en especial de Cristina.

A mis actuales compañeros de Denga S.A., por la paciencia y el apoyo mostrados durante estos cruciales últimos meses de redacción.

Mención especial merecen mi familia y mis amigos, a los cuales tengo que agradecer tantas cosas que con un simple “gracias” no es suficiente para expresar todo lo que han aportado, aportan y aportarán en mi vida.

En definitiva, a todos los citados y a los que faltan por mencionar, muchas gracias.



ÍNDICE



OBJETO DE LA TESIS.....	1
ACRÓNIMOS	7
CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN.....	13
1.- AGENTES TENSIOACTIVOS.....	15
1.1 - Antecedentes históricos.....	15
1.2 - Definición y propiedades.....	20
1.3 - Clasificación.....	25
1.4 - Consumo y usos	30
1.5 - Constitución de los detergentes	32
1.6 - Los tensioactivos y el ambiente.....	33
1.6.1 - Concepto de Biodegradación	33
1.6.2 - Ecosistemas.....	36
1.6.3 - El impacto ambiental de los tensioactivos	40
1.6.4 - Legislación ambiental	43
2.- TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS: JABÓN Y SULFATO DE ALQUILBENCENO LINEAL (LAS).....	46
2.1 - Descripción y propiedades del LAS y el jabón.....	46
2.1.1 - Descripción, propiedades físicas y químicas del LAS	46
2.1.2 - Descripción del jabón	49
2.1.3 - Propiedades físicas y químicas del jabón.....	51
2.1.4 - Capacidad detergente del jabón y del LAS	56
2.2 - Síntesis	59
2.2.1 - Síntesis del LAS.....	59
2.2.2 - Síntesis del jabón	65
2.3 - Consumo y aplicaciones	78
2.3.1 - Consumo y aplicaciones del LAS	78
2.3.2 - Consumo y aplicaciones del jabón.....	81
2.4 - Comportamiento ambiental del jabón y del LAS	84
2.4.1 - Biodegradabilidad del LAS.....	84
2.4.2 - Eliminación del LAS.....	96
2.4.3 - Estudios de monitorización.....	97

2.4.4 - Actividad ambiental del LAS.....	103
2.4.5 - El LAS y la salud Humana.....	105
2.4.6 - Biodegradabilidad del jabón	109
2.4.7 - Eliminación y monitorización del jabón	116
2.4.8 - Actividad ambiental del jabón	118
2.5 - Métodos para la determinación del LAS y el jabón.....	119
2.5.1 - Métodos para la determinación del LAS.....	119
2.5.2 - Métodos para la determinación del jabón.....	131
3.- LA VEGA DE GRANADA.....	136
3.1 - Antecedentes históricos.....	136
3.2 - Características físicas y socioeconómicas de la Vega de Granada	137
3.3 - Calidad de las aguas subterráneas en la Vega de Granada.....	138
CAPÍTULO 2- MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
1.- INTRODUCCIÓN.....	143
2.- DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS.....	143
2.1 - Disoluciones.....	143
2.2 - Reactivos.....	146
2.3 - Gases.....	147
2.4 - Disolventes.....	147
3.- MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN.....	148
3.1 - Material de laboratorio	148
3.2 - Instrumentación.....	150
3.2.1 - Cromatógrafo de líquidos.....	150
3.2.2 - Sonda ultrasónica digital.....	151
3.2.3 - Equipo de extracción.....	151
3.2.4 - Otros aparatos e instrumentos	152
4.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	153

5.- OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.....	154
5.1 - Métodos univariantes	154
5.2 - Métodos multivariantes	155
5.2.1 - Diseños experimentales.....	156
5.2.2 - Idoneidad del modelo.....	159
6.- CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO	164
6.1 - Rechazo de valores anómalos.....	167
6.2 - Función de calibración	168
6.3 - Parámetros de calidad del método analítico	171
6.3.1 - Rango dinámico lineal y Linealidad.....	172
6.3.2 - Precisión	173
6.3.3 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	173
6.3.4 - Límites de detección y cuantificación.....	175
7.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	184
7.1 - Ensayos de recuperación	184
7.2 - Metodología de adición de patrón	185
CAPÍTULO 3- DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES	191
1.- INTRODUCCIÓN.....	193
2.- DETERMINACIÓN DE JABÓN POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	194
2.1 - Síntesis del jabón.....	194
2.1.1 - Patrones individuales	194
2.1.2 - Patrón de jabón proveniente del ácido graso de coco.....	198
2.2 - Optimización de las variables implicadas en el proceso cromatográfico.....	201
2.2.1 - Selección de la fase estacionaria	202
2.2.2 - Optimización del gradiente y del flujo.....	209
2.2.3 - Composición de la fase móvil.....	213
2.2.4 - Temperatura de la columna y la ganancia del fotomultiplicador.....	221
2.2.5 - Optimización de la longitud de onda de excitación y de emisión	225

2.2.6 - Optimización de la composición del vial y el volumen de inyección..	226
2.2.7 - Resultados óptimos	230
2.3 - Optimización de la reacción de derivación para fluorescencia	232
2.3.1 - Justificación de la reacción de derivación	232
2.3.2 - Elección de la reacción de derivación	233
2.3.3 - Elección del patrón interno	235
2.3.4 - Elección del disolvente para la reacción de derivación	235
2.3.5 - Optimización del tiempo y la temperatura de reacción	237
2.3.6 - Optimización del volumen de reacción y de la cantidad de reactivos .	244
2.3.7 - Cantidad máxima de analito a derivar	250
2.3.8 - Estudio de la estabilidad de la reacción de derivación	251
2.3.9 - Resumen del protocolo de derivación optimizado	252
2.3.10 -Prueba de derivación en muestra real.....	253
2.4 - Optimización de la reacción de derivación para ultravioleta	254
2.4.1 - Justificación y elección de la reacción de derivación.....	254
2.4.2 - Método cromatográfico. Selección de la λ máxima de absorción	256
2.4.3 - Elección del dte de la reacción de derivación y del patrón interno	258
2.4.4 - Optimización del tiempo y la temperatura de reacción	260
2.4.5 - Optimización volumen de reacción y de la cantidad de reactivos	265
2.4.6 - Estudio de la estabilidad de la reacción de derivación	269
2.4.7 - Resumen del protocolo de derivación optimizado	269
2.4.8 - Prueba de derivación en muestra real.....	270
3.- DETERMINACIÓN DEL LAS POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	271
3.1 - Contextualización.....	271
3.2 - Elección del patrón interno.....	274
3.3 - Composición del vial de inyección.....	275
3.4 - Aplicación en muestra real	277
CAPÍTULO 4- TRATAMIENTO DE MUESTRA	279
1.- INTRODUCCIÓN.....	281
2.- TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE JABÓN....	282

2.1 - Antecedentes previos y justificación	282
2.2 - Variables implicadas en el proceso de extracción con éter de petróleo	284
2.2.1 - Soxhlet	287
2.2.2 - Ultrasonidos	290
2.2.3 - Microondas	296
2.2.4 - Conclusiones	299
2.3 - Variables implicadas en el proceso de conversión de jabón cálcico	301
2.4 - Variables implicadas en el proceso de extracción del jabón potásico	308
2.4.1 - Soxhlet	310
2.4.2 - Ultrasonidos	311
2.4.3 - Microondas	314
2.4.4 - Conclusiones	316
2.4.5 - Estudio de la etapa de centrifugación	317
2.4.6 - Resumen del tratamiento de muestra	318
3.- TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS	322
3.1 - Antecedentes previos y justificación	322
3.2 - Variables implicadas en el proceso de extracción	323
3.1.1 - Soxhlet	325
3.1.2 - Ultrasonidos	326
3.1.3 - Microondas	327
3.1.4 - Conclusiones	328
3.3 - Estudio del proceso de extracción en fase sólida	330
CAPÍTULO 5- TRATAMIENTO DE MUESTRA	333
1.- INTRODUCCIÓN	335
2.- METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN: CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE JABÓN	336
2.1 - Justificación y propuesta de la metodología de cuantificación	336
2.2 - Evaluación del efecto matriz y de la recuperación	340
2.2.1 - Soxhlet	342
2.2.2 - Ultrasonidos	348
2.2.3 - Microondas	354

2.2.4 - Comparación entre técnicas de extracción	360
2.2.5 - Conclusiones.....	362
2.3 - Cálculo de los parámetros analíticos	363
2.3.1 - Verificación del modelo.....	365
2.3.2 - Límite de detección y cuantificación	365
2.3.3 - Rango dinámico lineal y linealidad.....	367
2.3.4 - Precisión	369
2.3.5 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	369
3.- METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN: CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DEL LAS.....	370
3.1 - Justificación y propuesta de metodología de validación.....	370
3.2 - Evaluación del efecto matriz y de la recuperación	372
3.2.1 - Soxhlet.....	372
3.2.2 - Ultrasonidos.....	378
3.2.3 - Microondas	384
3.2.4 - Comparación entre técnicas de extracción	390
3.2.5 - Conclusiones.....	391
3.3 - Cálculo de los parámetros analíticos.....	392
3.3.1 - Verificación del modelo.....	394
3.3.2 - Límite de detección y cuantificación	394
3.3.3 - Rango dinámico lineal y linealidad.....	395
3.3.4 - Precisión	396
3.3.5 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	397
4.- INTERCOMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	397
4.1 - Contextualización.....	397
4.2 - Intercomparación de técnicas de extracción para el jabón.....	399
4.3 - Intercomparación de técnicas de derivación para el jabón.....	401
4.4 - Intercomparación de técnicas de extracción para el LAS	402
4.5 - Conclusiones	404
CAPÍTULO 6- DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN LODOS.....	405
1.- INTRODUCCIÓN.....	407

2.- DETERMINACIÓN DE LAS EN LODOS DE EDAR.....	408
2.1 - Contextualización.....	408
2.2 - Caracterización de las muestras.....	410
2.3 - Tratamiento de muestra.....	413
2.4 - Resultados.....	414
2.5 - Tratamiento estadístico.....	419
2.6 - Discusión.....	424
3.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN LODOS DE EDAR.....	427
3.1 - Contextualización.....	427
3.2 - Caracterización de las muestras.....	428
3.3 - Tratamiento de muestra.....	430
3.4 - Resultados.....	432
3.5 - Tratamiento estadístico.....	435
3.6 - Discusión.....	437
4.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL JABÓN Y EL LAS.....	439
CAPÍTULO 7- DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN SEDIMENTOS MARINOS.....	443
1.- INTRODUCCIÓN.....	445
2.- DETERMINACIÓN DE LAS EN SEDIMENTOS MARINOS.....	446
2.1 - Contextualización.....	446
2.2 - Caracterización de las muestras.....	447
2.3 - Tratamiento de muestra.....	450
2.4 - Resultados.....	451
2.5 - Tratamiento estadístico.....	455
2.6 - Discusión.....	457
3.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN SEDIMENTOS MARINOS.....	458
3.1 - Contextualización.....	458
3.2 - Caracterización de las muestras.....	459
3.3 - Tratamiento de muestra.....	461

3.4 - Resultados	462
3.5 - Tratamiento estadístico.....	465
3.6 - Discusión.....	467
4.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL JABÓN Y EL LAS	468
5.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN TIERRA	469
5.1 - Contextualización.....	469
5.2 - Caracterización de las muestras.....	470
5.3 - Tratamiento de muestra	471
5.4 - Resultados	471
5.5 - Discusión.....	473
CAPÍTULO 8- ESTUDIO DE CAMPO.....	475
1 - INTRODUCCIÓN.....	477
2 - CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y DEL AGUA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO	478
2.1 - Estudio del suelo empleado.....	478
2.1.1 - Propiedades físicas del suelo.....	479
2.1.2 - Propiedades químicas del suelo	487
2.2 - Estudio del agua de pozo empleado	496
3 - ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN/ DESORCIÓN DEL JABON EN LABORATORIO	500
3.1 - Experiencia en discontinuo (tanque)	500
3.1.1 - Relación suelo/disolución	501
3.1.2 - Aplicación de modelos simples al estudio de adsorción/desorción.	505
3.1.3 - Control del pH	512
3.1.4 - Establecimiento de las Isotermas	512
3.1.5 - Aplicación de un modelo complejo a la adsorción/ desorción	522
3.2 - Experiencia en continuo (columna).....	544
3.2.1 - Descripción de la instalación experimental.....	544
3.2.2 - Columnas ensayadas	547

4 - EXPERIENCIA EN CAMPO.....	550
4.1 - Descripción de las parcelas experimentales.....	550
4.2 - Ensayo con jabón	552
4.2.1 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de suelo	552
4.2.2 - Estudio estacional	553
4.2.3 - Estudio comparado de los resultados de campo	576
CONCLUSIONS.....	585
SUMMARY	597

OBJETO DE LA TESIS

El objeto de la presente Memoria de Doctorado es el estudio del comportamiento ambiental de los dos tensioactivos aniónicos de mayor consumo a nivel mundial: el jabón y el sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS).

Este estudio forma parte de los proyectos de investigación:

“*ESTUDIO DE LIXIVIACION/DEGRADACION DE TENSIOACTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL EN SUELOS AGRÍCOLAS*” (Ref. P06-FQM-01529) y “*EVOLUCIÓN QUÍMICA DE TENSIOACTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL EN AGUAS, SUELOS Y SEDIMENTOS ACUÁTICOS: IMPLICACIONES AMBIENTALES*” (Ref. CTQ2007-61503/PPQ), financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Junta de Andalucía respectivamente.

Ambos proyectos se llevan a cabo en el grupo de investigación de Química Analítica de la Universidad de Granada, FQM-338 QUÍMICA ANALÍTICA Y CIENCIAS DE LA VIDA. Con el apoyo de la empresa CEPSA QUÍMICA, el mayor fabricante de Alquilbenceno Lineal (LAB, precursor del LAS).

La creciente preocupación de la Unión Europea en materia de regulación de tensioactivos, conjunto con la escasez de información ambiental relevante del jabón, debido, entre otras cosas, a la falta de metodologías analíticas capaces de determinar el jabón en diferentes matrices ambientales, y su indudable importancia económica, justifican, por sí mismos, el estudio medioambiental del jabón. Del mismo modo, y a pesar de la existencia de numerosas publicaciones acerca del comportamiento ambiental del LAS, el interés del mismo radica en las novedosas

conclusiones que se pueden derivar de su estudio y monitorización, conjunto con el jabón, en diferentes matrices ambientales.

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 reúne las condiciones idóneas para llevar a cabo la investigación propuesta, pues está 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.

Con este estudio se pretende, por una parte, mejorar la metodología existente para la detección y determinación de los tensioactivos 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.

Para alcanzar el objetivo central hemos trazado una serie de objetivos operativos:

1.- Desarrollo de las metodologías analíticas. Atendiendo a las propiedades analíticas de los compuestos objeto de estudio, se han seleccionado las técnicas analíticas separativas de cromatografía de

líquidos con detección fluorescente y con detección ultravioleta-visible, siempre llevando a cabo los oportunos tratamientos previos de muestra y derivación de los analitos.

2.- Aplicación de las metodologías propuestas en diferentes matrices ambientales: suelos, lodos de EDAR y sedimentos.

3.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos para ambos tensioactivos.

3.- Estudio del jabón en el laboratorio:

2.1.- Estudios en tanque (Batch). Establecimiento de las cinéticas e isotermas de adsorción.

2.2.- Estudios en columna:

2.3.- Establecimiento de los modelos de comportamiento.

4.- Estudio del jabón en campo: Estudio del comportamiento del jabón 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.



ACRÓNIMOS



a	Ordenada en el origen
ACN	Acetonitrilo
AE	Alcohol etoxilado
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
ANOVA	Análisis de la varianza
AOCS	American Oil Chemist Society
ASTM	American Society for Testing and Materials
b	Pendiente de la función de calibrado
BAB	Alquilbenceno ramificado
BABS	Sulfonato de alquilbenceno ramificado
BrMMC	4-Bromometil-7-metoxicumarina
CE	Electroforesis capilar
C₀	Concentración inicial
C_e	Concentración en equilibrio de un compuesto en disolución
CESIO	Comite Europeen Des Agents De Surface Et De Leurs Intermediaires Organiques
CMC	Concentración miscelar crítica
DAD	Detector diodo array
DAP	2,4 Dibromoacetofenona
DATS	Tetralinas sulfonadas
DER	Desviación estándar relativa
D_p	Diámetro de la partícula
DSR	Diseños de superficie de respuesta
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
FAC	Fat Analysis Commitee
F_{cal}	El valor de F de Snedecor calculado
FLD	Detector de fluorescencia
FID	Detector de ionización de llama
FSM	Finca de Santa María

FFR	Falling Film Reactors
F_{tab}	El valor de F de Snedecor tabulado
GC	Cromatografía de gases
GREAT-ER	Geography-Referenced Exposure Assessment Toll for European Rivers
HERA	Human and environmental risk assessment
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
h_{0,5}	Mitad de la altura del pico gaussiano
IPA	2-propanol (Isopropanol)
K	Constante de degradación
K_a	Velocidad específica de adsorción
K_{ads}	Constante de equilibrio de adsorción
K_d	Constante de adsorción suelo-agua
K_{des}	Velocidad específica de desorción
K_{dis}	Constante de disolución
K_f	Constante de adsorción de Freundlich
K_L	Constante de adsorción de Langmuir
K_p	Constante de precipitación
LAB	Alquilbenceno lineal
LAS	Sulfonato de alquilbenceno lineal
LC	Cromatografía líquida
LC₅₀	Concentración que resulta letal para el 50% de los organismos expuestos durante un periodo especificado, normalmente 96 horas
LD	Límite de detección
LIN	Linealidad
LOAEL	Indicador del nivel más bajo de una sustancia con efecto tóxico
LQ	Límite de cuantificación
LSC	Liquid Scintillation Counting

MAE	Extracción asistida por microondas
MBAS	Methylene Blue Active Substance
MeOH	Metanol
M.O.	Materia orgánica
MOE	Margen de exposición de un sustancia
MS	Detector de espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
n^s	Moles adsorbidos por unidad de masa de adsorbente
NOAEL	Indicador de los efectos tóxicos de una sustancia
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
p	Parámetro estadístico que mide la significancia en el test de ANOVA
PC	Componente principal
PCA	Análisis por componentes principales
PEC	Concentración previsible en el medio ambiente
PNEC	Concentración máxima esperada que no produzca ningún efecto
R²	Coefficiente de determinación de la función de calibrado
RDL	Rango dinámico lineal
RP	Fase inversa
rpm	Revoluciones por minuto
R_s	Resolución
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SPE	Extracción en fase sólida
SPC	Sulfo Phenyl caboxylic Acid
S_{analítica}	Sensibilidad analítica
S_{y/x}	Desviación estándar de la regresión
S_a	Desviación estándar de la ordenada en el

	origen
S_b	Desviación estándar de la pendiente
SIM	Selected Ion Monitoring
t_{cal}	El valor de t de Student calculado
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
t_r	Tiempo de retención
t_{tab}	El valor de t de Student tabulado
T_K	Punto de Kraft
$t_{0.5}$	Tiempo de vida media
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
V_∞	Velocidad estacionaria de caída
W_b	Anchura de la base del pico cromatográfico
W_{b0}	Anchura de la base del pico cromatográfico a concentración cero
$W_{0.5h}$	Anchura a mitad de altura del pico cromatográfico
X	Cantidad de retención de un compuesto en un sólido
X_{max}	Cantidad máxima de retención de un compuesto en un sólido
\emptyset	Radical fenilo
λ	Longitud de onda
θ	Porosidad

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1.- AGENTES TENSIOACTIVOS

1.1 - Antecedentes históricos

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, las cuales han buscado aditivos que mejorasen la capacidad limpiadora del agua.

El jabón fue el primer compuesto conocido capaz de mejorar las propiedades deterativas del agua. Su descubrimiento se data en la época los Sumerios¹(3000 a.C.), siendo usado no sólo por su actividad deterativa, sino también por las propiedades curativas que se le atribuían. De hecho, se utilizaba el azufre jabonoso obtenido para la cura de enfermedades.

¹ García Domínguez J.J. *Tensioactivos y Detergencia*. AID/ADTA. Barcelona, 1986.

En un papiro que data del 1500 a.C., que constituye todo un tratado médico, se describía que mezclando aceites animales y vegetales con ciertas sales, que debían ser de tipo alcalino, se obtenía un producto de tipo jabonoso, el cual se utilizaba para combatir enfermedades en la piel.² La popularidad del jabón fue creciendo de manera progresiva, llegando, en su momento más álgido (siglo VII), a considerarse un artículo de lujo, ya que se llegó a afirmar que el crecimiento de la población, que experimentó Europa en la Edad Media, era fruto de la mejora de la higiene derivada del uso del jabón en todas las clases sociales. Un estudio más concienzudo reveló que la mejora en la calidad de vida era consecuencia no sólo de una mejor higiene personal, sino también a los enormes progresos médicos en la lucha contra la enfermedad, y en la protección contra el contagio³.

A pesar de su creciente uso, el jabón seguía produciéndose de manera artesanal. Esta dinámica cambió a mediados del siglo XVIII cuando Nicolás Leblanc (1787) fue capaz de diseñar un procedimiento para la obtención de jabón a escala industrial, lo cual sentaría las bases de la Química Industrial de tensioactivos moderna⁴.

La química del jabón continuó su desarrollo en los siglos XIX y XX, ya que se amplió la gama de productos derivados del jabón: en polvo, en barra, etc. Además, La demanda de detergentes empezó a aumentar, debido al creciente uso de las fibras sintéticas (celulosa, acetatos, etc.).

² Varo Galván P. *Contribución al estudio sobre el comportamiento ambiental y degradación de jabones*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, 1996

³ Sanchez-Leal J. *Aspectos ecológicos de los detergentes*. Gestió y promoció editorial. Barcelona, 1992.

⁴ Spitz L. Editor. *SODEOPEC*. AOCS press, 2004.

Henkel, en Alemania, introdujo en 1907 el primer detergente en polvo “Persil” para lavadoras automáticas.

La necesidad de buscar nuevas sustancias capaz de mejorar la propiedades del jabón llevó a dos investigadores norteamericanos, Harkins y Lagmuir, a descubrir, casi simultáneamente, en 1917, una clase de sustancias sintéticas equiparables al jabón, y dotadas, asimismo, de la propiedad de acumularse en las superficies de las disoluciones. La peculiaridad de su comportamiento se explicaba por su estructura, ya que estaban compuestas por una parte polar, hidrofílica, y otra apolar, hidrofóbica. A este grupo de sustancias se las denominó “tensioactivos”.

En 1917, el químico Günter, perteneciente a la compañía BASF, consiguió con éxito la alquilación y la sulfonación del naftaleno. Este hecho llevó a conseguir una sustancia de alto poder espumante y con buenas propiedades de mojado; sin embargo, las cortas cadenas del alquilnaftaleno sulfonato no consiguieron tener el suficiente carácter tensioactivo para sustituir al jabón convencional.

En 1928, Bertsch y colaboradores utilizando un alcohol graso como materia prima, y mediante sulfatación, consiguieron la primera sustancia detergente sintética. El paso siguiente era encontrar materias primas renovables. El procedimiento fue la reducción catalítica con hidrógeno.

La empresa Henkel, en 1932, comercializó alcoholes oleico y esteárico procedentes del aceite del esperma de ballena, extendiéndolo al alcohol láurico y mirístico (C_{12} y C_{14}), pues éstos poseían mejores propiedades deterativas.

El primer detergente formulado con sulfatos de alcoholes grasos se introdujo en el mercado por Henkel en 1932, y por Procter & Gamble en 1933. Posteriormente, aparecieron en el mercado otros productos semejantes.

Por necesidades de mayor volumen de producción, aparecieron en el mercado los alquilbencenos sulfonatos (ABS) y el tetrapropilénbenceno sulfonato (TBS), que, en 1950, satisfacía el 60% de la demanda de detergentes en el mercado mundial. Sin embargo, en 1960, fue reemplazado por los alquilbencenos sulfonatos de cadena lineal, debido a que eran más biodegradables.⁵

En la **Tabla 1.1**, se resume el desarrollo histórico de los detergentes.⁶

⁵ Kreienfeld G. *Surfactants in consumer products and raw material situation: A brief survey*. in Alkyl Polyglycosides: Technology. Properties and Applications, K. Hill, W. von Rybinski, G. Stoll (Eds.). p. 225, VCH, Weinheim, 1997.

⁶ Lechuga Villena M. *Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2005.

Tabla 1.1- Evolución histórica de los tensioactivos.

ÉPOCA Y HECHOS CRONOLÓGICOS	OBSERVACIONES
ERA ANTES DE CRISTO	
<i>Año 3000</i> , en Sumeria	Tablilla sumeria de arcilla donde se habla de “azufre jabonoso”.
<i>Año 2500</i> , en Mesopotamia	Placa de arcilla con la descripción de la fabricación de jabón (aceite + hierba jabonosa).
<i>Año 1500</i> , en Egipto	Grabados y papiros. Descripción (aceites animales + vegetales + sales).
<i>Año 600</i>	Introducción en Europa.
ERA CRISTIANA	
Primera generación de detergentes	
Imperio Romano	Extractos de cenizas + grasas para ungüentos.
<i>Año 800</i> , Almonas, Andalucía	Fabricación con aceite de oliva y el álcali obtenido de las cenizas de la combustión de los amarjos (solanácea de las marismas de Guadalquivir).
<i>Año 1000</i> , Marsella y Venecia	Centros del negocio de fabricación de jabón (siglos IX-XIV).
<i>Año 1300</i> , fundación de gremios europeos	Desarrollo importante de la fabricación del jabón.
<i>Año 1791</i> , Descubrimiento de Leblanc	Método Leblanc para la preparación de carbonato sódico. Inicio de la Industria Química.
<i>Año 1799</i> , Aportación de Tennant	Obtención de cloruro de cal, que permitía obtener Cl_2 para blanqueamiento del algodón.
<i>Año 1823</i> , Trabajos de Chevreul	Inicio de nuevas industrias. Repercusión en el incremento exponencial de la población en Europa.

Tabla 1.1. Evolución histórica de los tensioactivos. (cont.)

ÉPOCA Y HECHOS CRONOLÓGICOS	OBSERVACIONES
Segunda generación de detergentes	
<i>Año 1917</i> , descubrimientos de Harkins y Langmuir	Sustancias sintéticas equiparables al jabón.
<i>Año 1925</i> , en Alemania, después de la Primera Guerra Mundial	Alquilarilsulfonatos y butilnaftalensulfonatos sódicos.
<i>Año 1928</i> , hidrogenación y posterior sulfatación del grupo carboxílico	Obtención de alcoholes grasos sulfatados.
<i>Año 1930</i> , condensación de ácidos grasos	Desarrollo de tensioactivos no iónicos
Tercera generación de detergentes	
<i>Período 1950-1980</i>	Fabricación de mesolatos. Desarrollo de los “Builders”. Principios de la Química-Física Interfacial.
<i>Año 2000- Actualidad</i>	Desarrollo de detergentes biodegradables

1.2 - Definición y propiedades

Según la Real Academia de la Lengua Española⁷, se denomina surfactante a aquella “sustancia que reduce la tensión superficial de un líquido, y que sirve como agente humectante o detergente”. Este término, surfactante, es un anglicismo del término anglosajón “*Surface Active Agent*”. Del mismo modo, se define tensión superficial como⁸ “la acción de las fuerzas moleculares, en virtud de la cual, la capa exterior de los líquidos tiende a contener el volumen de estos dentro de la mínima superficie”.

⁷ Página web del Diccionario de la Real Academia Española:
http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=surfactante.

⁸ Página web del Diccionario de la Real Academia Española:
http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=tensi%F3n

A pesar de que el término tensioactivo no se encuentra recogido por la Real Academia de la Lengua, es, sin embargo, la palabra más frecuentemente utilizada como traducción del término “Surfactant” en todas las normativas europeas adoptadas desde su principio hasta la actualidad, razón por la cual en esta memoria se utilizará este término⁹.

En cuanto a su estructura la constitución química de un tensioactivo comprende¹⁰:

- Un grupo hidrofílico.
- Un grupo hidrofóbico.

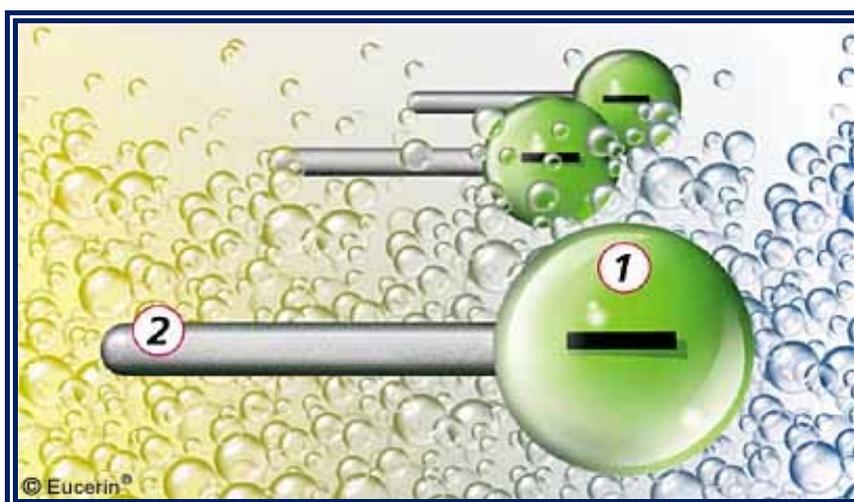


Figura 1.1- Estructura de un tensioactivo: 1. Parte hidrofílica, 2. Parte hidrofóbica.

⁹ Nimer M. *Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) en una parcela agrícola de la Vega de Granada*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2007.

¹⁰ Myers D. *Surfactant science and Technology*. VCH publishers, 1998.

En disolución acuosa, la parte hidrofílica de la molécula se orienta hacia el interior de la disolución, mientras que la parte hidrofóbica lo hace hacia la superficie. Las moléculas de tensioactivos así orientadas se acumulan en la interfase agua / aire, con lo que reducen la tensión superficial del agua.

Respecto a las propiedades generales de los tensioactivos son importantes las siguientes:

- Compuestos anfifílicos: Contienen, a la vez, en su molécula a uno o varios grupos polares y uno o varios grupos no polares, generalmente, una cadena hidrocarbonada soluble en disolventes orgánicos y un grupo iónico soluble en agua. Debido a su estructura, cuando se pone en contacto una cantidad muy pequeña de tensioactivo con el agua aparecen dos tendencias opuestas; por una parte, el grupo hidrofílico del tensioactivo tiende a situarse en el interior del medio acuoso; y por otra, las moléculas de agua tienden a expulsar del medio acuoso las cadenas hidrófobas de las moléculas e iones anfifílicos. El estado de equilibrio se alcanza cuando las moléculas y/o iones de tensioactivo se distribuyen entre el interior de la disolución y la interfase con el aire. En esta capa se adsorberán las moléculas o iones de tensioactivo, de forma que los grupos hidrófilos puedan estar convenientemente hidratados, y las cadenas hidrófobas estén libres del contacto del medio acuoso.

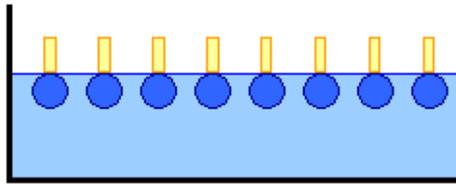


Figura 1.2- Monocapa de tensioactivo.

- Humectabilidad: El mojado constituye un mecanismo fundamental que interviene en la mayor parte de las aplicaciones de los agentes tensioactivos. Es una característica que depende de las propiedades superficiales.
- Poder espumante: La espuma se puede definir como un conjunto de celdas gaseosas separadas por láminas delgadas de líquido, el cual está formado por la superposición de burbujas originadas por una dispersión de un gas o un líquido.

La formación de espuma es otro de los efectos que depende de las propiedades superficiales de las disoluciones de los agentes tensioactivos. No existe una explicación satisfactoria para exponer todos los fenómenos relativos a las espumas, pero se admite, por lo general, que el fenómeno se debe a la tendencia que tiene una burbuja de aire, introducida en una disolución de agente tensioactivo, para rodearse inmediatamente de una capa monomolecular. Cuando la burbuja rompe la superficie, consigue formar una película superficial monomolecular, y de esta manera, se encuentra compuesta por una lámina que está formada por dos

capas monomoleculares de agentes tensioactivos, las cuales están separadas por una película de agua.

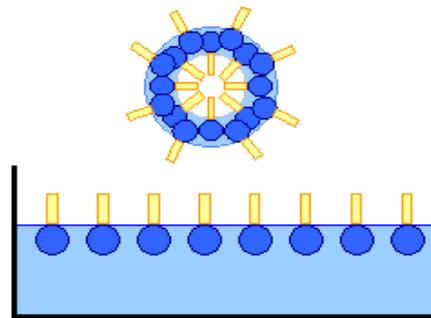


Figura 1.3- Burbuja de jabón.

- Formación de micelas: Cuando un compuesto anfifílico está en disolución acuosa, para evitar el contacto desfavorable entre la parte hidrófoba y el disolvente, además de adsorberse en la interfaz, existe otra alternativa: la de asociarse moléculas anfifílicas formando agregados moleculares, iónicos o mixtos llamados micelas, que se forman por encima de una cierta concentración, denominada concentración crítica micelar (C.M.C.), que se define como el pequeño margen de concentraciones, por debajo del cual, no existen micelas, y por encima del mismo, las moléculas e iones se asocian en forma micelar.

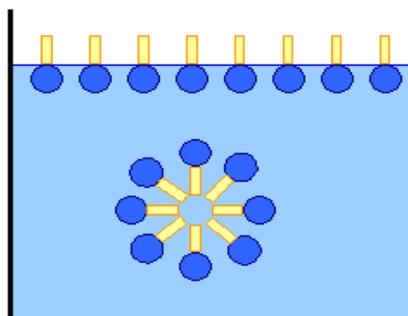


Figura 1.4- Formación de micelas.

1.3 - Clasificación

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

Atendiendo la naturaleza de su grupo hidrófilo, los tensioactivos se pueden clasificar en no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros.

➤ **Tensioactivos aniónicos:** son los tensioactivos más consumidos en términos absolutos. Se caracterizan por tener, en su parte hidrofílica, grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa, originando iones orgánicos con carga negativa, los cuales son responsables de la actividad superficial. Contienen, por lo general, grupos solubles, sulfatos o sulfonatos de sodio; aunque, tradicionalmente, consistían en grupos

carboxilatos como los que hay presentes en el jabón. Existen, por lo tanto, varias clases de tensioactivos aniónicos, como por ejemplo: los sulfonatos de alquilbenceno lineal (LAS), los alcoholes etoxisulfatos (AES) y los alcoholes sulfatos (AS). A continuación, **Figura 1.5**, se recogen algunos ejemplos de tensioactivos aniónicos:

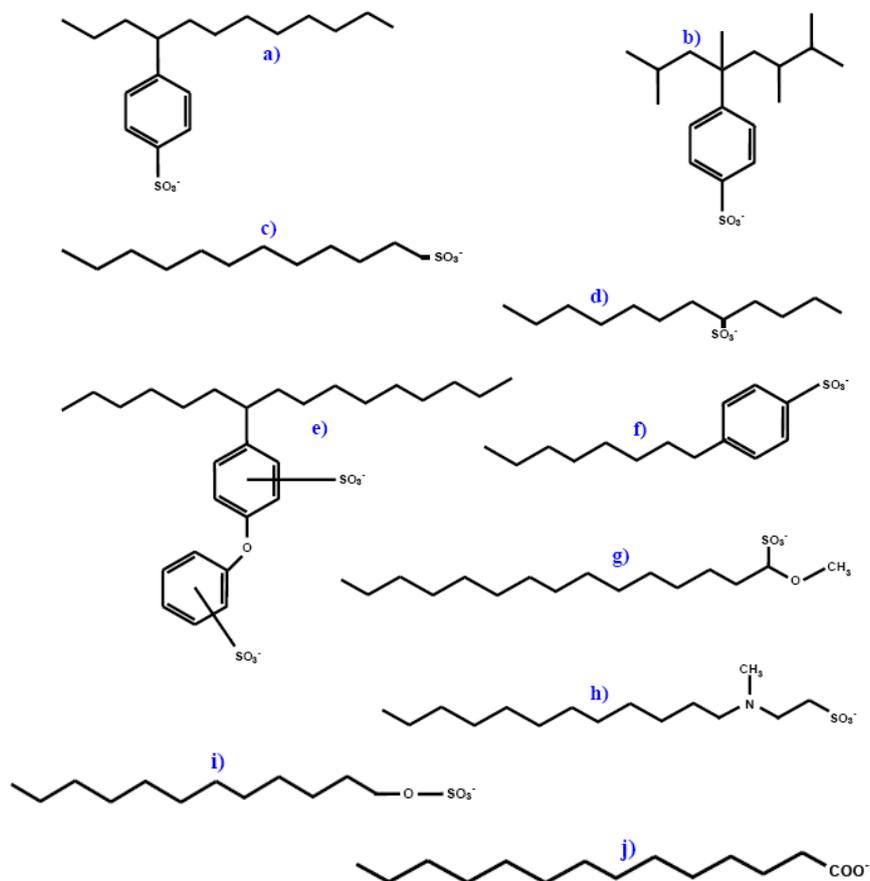


Figura 1.5- Ejemplos de tensioactivos aniónicos: a) Sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS); b) Sulfonato de alquilbenceno ramificado; c) Sulfonato de n-alkilo; d) Sulfonato de alquilo secundario; e) Difeniléterdisulfonato de hexadecano lineal; f) Sulfonato de 4-(1-n-octil)benceno; g) Sulfonato de metiléster; h) Taurato de alquilmetil; i) Sulfato de n-alkilo; j) Carboxilato de alquilo (jabón).

➤ **Tensioactivos catiónicos:** Al contrario que los aniónicos, estos compuestos presentan grupo catiónico en su parte polar; son, normalmente, una sal de amonio cuaternaria, amina o sal de fosfonio, la cual está unida a una cadena carbonada de distinta naturaleza (**Figura 1.6**). Presentan la ventaja de que son compatibles con los tensioactivos no iónicos y anfotéricos, y la desventaja de ser incompatibles con los tensioactivos aniónicos. Puede darse el caso, en disoluciones ácidas, que los tensioactivos no iónicos puedan adoptar carácter catiónicos, debido a la protonación del heteroátomo; sin embargo, estrictamente hablando, los tensioactivos aniónicos son aquellos que para poseer una carga negativa no requieren de protonación. Su uso es más limitado, siendo utilizados, 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 que su principal aplicación sea en formulaciones de productos suavizantes. A este tipo de compuestos se les atribuyen propiedades antibacterianas; además, se usan como inhibidor de la corrosión, de procesos de oxidación, y son muy utilizados en procesos de síntesis como agente transferente entre fases.

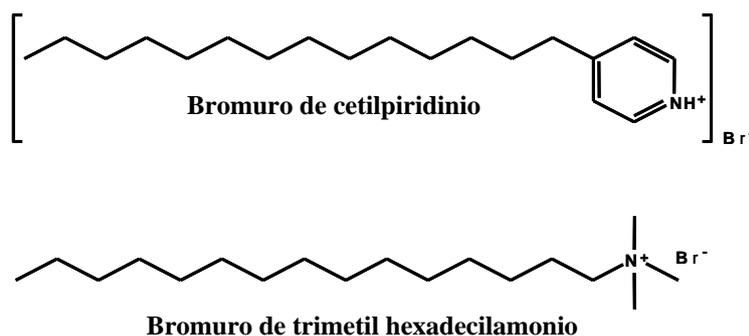


Figura 1.6- Ejemplos de tensioactivos catiónicos.

➤ **Tensioactivos anfóteros:** poseen grupos funcionales que pueden ionizarse en medio acuoso, originando tensioactivos aniónicos o catiónicos, dependiendo de las condiciones del medio. 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 en el medio.

Las betainas no poseen protones hidrolizables, adquieren naturaleza catiónica en medios fuertemente ácidos. No son sensibles ni a la dureza del agua ni al valor de pH que se trabaja en la industria. Son compatibles con otros tipos de tensioactivos, y presentan buenas propiedades espumantes y detergentes. A continuación, **Figura 1.7**, se representa la estructura básica de las betainas:

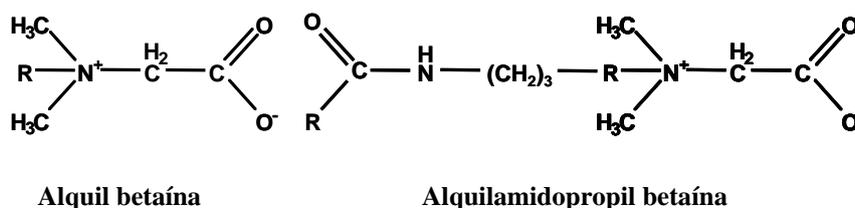


Figura 1.7- Ejemplo de tensioactivos anfotéricos.

➤ **Tensioactivos no iónicos:** En disolución acuosa no originan iones, su solubilidad en agua es debida a la polaridad del átomo de oxígeno, el cual permanece unido covalentemente en los oligoetilenglicol éteres (también denominados poliglicol éteres) y compuestos oligohidróxidos. El

grado de hidratación decrece con el aumento de la temperatura, disminuyendo, por tanto, su solubilidad. La cadena carbonada (parte hidrofóbica) tiene que estar en una adecuada relación con el número de grupos polares, debido a que una relación demasiado baja entre el número de heteroátomos y la cadena carbonada puede derivar en problemas de insolubilidad en agua. Los tensioactivos de este tipo más ampliamente utilizados son los alcoholes etoxilados (AE). Dependiendo del grado de etoxilación, se obtienen productos con un balance hidrófilo-lipófilo distinto y 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 temperatura ambiente, sin embargo, a medida que aumenta su peso molecular, tienden a ser más pastosos, llegando, en caso más extremo, a formar un estado sólido céreo. Forman micelas con mayor facilidad que los tensioactivos iónicos, debido a que las repulsiones electrostáticas en la superficie de los no iónicos son menores. Otra característica que los diferencia es su comportamiento en el “agua dura”, ya que en presencia de iones cálcico y magnesio, los alcoholes etoxilados presentan un menor tendencia a precipitar que los tensioactivos aniónicos.

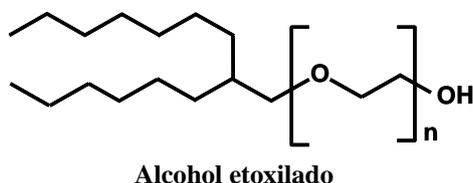


Figura 1.8- Ejemplo de tensioactivo no iónico.

1.4 - Consumo y usos

Tanto el consumo como el uso de los tensioactivos dependen de sus propiedades, siendo las más demandadas aquellas sustancias que tiene un mayor rango de aplicación. Por lo tanto, los tensioactivos no iónicos como los aniónicos son, por este orden, los que se producen en mayor cantidad¹¹.

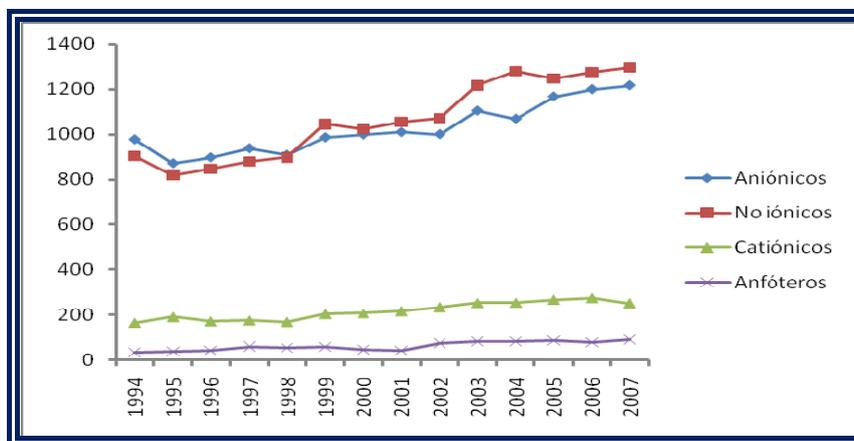


Figura 1.9- Producción de tensioactivos en Europa Occidental-1. Miles de toneladas.

¹¹ COMITE EUROPEEN DES AGENTS DE SURFACE ET DE LEURS INTERMEDIAIRES ORGANIQUES (CESIO). *Cesio surfactants statistics for Western Europe 2007*.

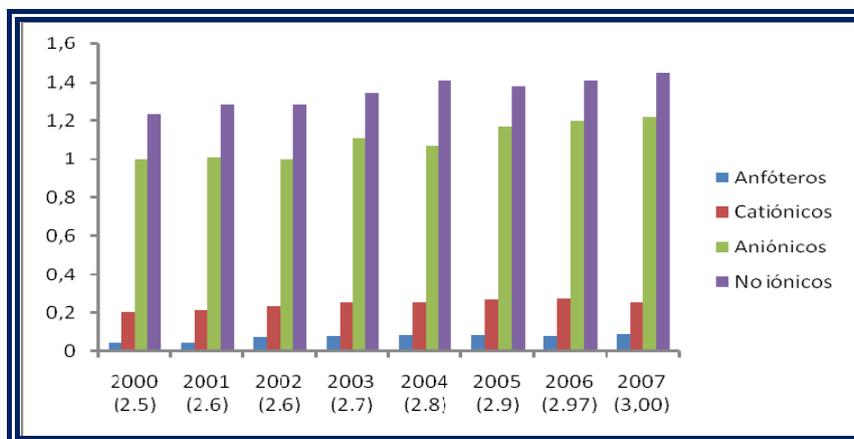


Figura 1.10- Producción de tensioactivos en Europa Occidental-2. Millones de toneladas.

En cuanto a sus aplicaciones, en la siguiente tabla se enumeran los usos más frecuentes de los tensioactivos².

Tabla 1.2- Usos de los tensioactivos.

Detergentes y productos de limpieza	Curtido de la piel
Cosméticos	Polimerización de látex
Tratamiento de metales	Dispersantes y emulsificadores en agricultura
Aditivos de aceites lubricantes	Emulsificadores del petróleo, ceras y disolventes
Aditivos en gasolinas, gas-oil y otros combustibles	Agentes espumantes
Inhibidores de corrosión	Espuma para extinción de incendios
Agentes de mojado y auxiliares de proceso en industria textil	Operaciones de extracción de petróleo
Dispersión de colorantes	Inhibidores de precipitación
Flotación de minerales	Desengrasado de metales
Plásticos, lacas y pinturas	Efectos antiespumantes
Eliminación de polvo	Lavado en seco
Construcción	Plastificación / Fluidización de cementos
Industria del papel	Industrias de alimentación

1.5 - Constitución de los detergentes

Las actuales formulaciones comerciales de productos de limpieza, tanto líquidas como sólidas, están constituidas por una mezcla de uno o varios tensioactivos, que actúan mejorando la acción detergente junto con 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 ambiente. En estas formulaciones complejas, coexisten dos o más agentes tensioactivos, incluso pertenecientes a distintos grupos (aniónicos y/o no iónicos), lo cual 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 aproximadamente 1 gramo de tensioactivo por 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 1.11**, se puede apreciar un esquema sobre los componentes de las formulaciones actuales de tensioactivos según *Domínguez*¹¹:

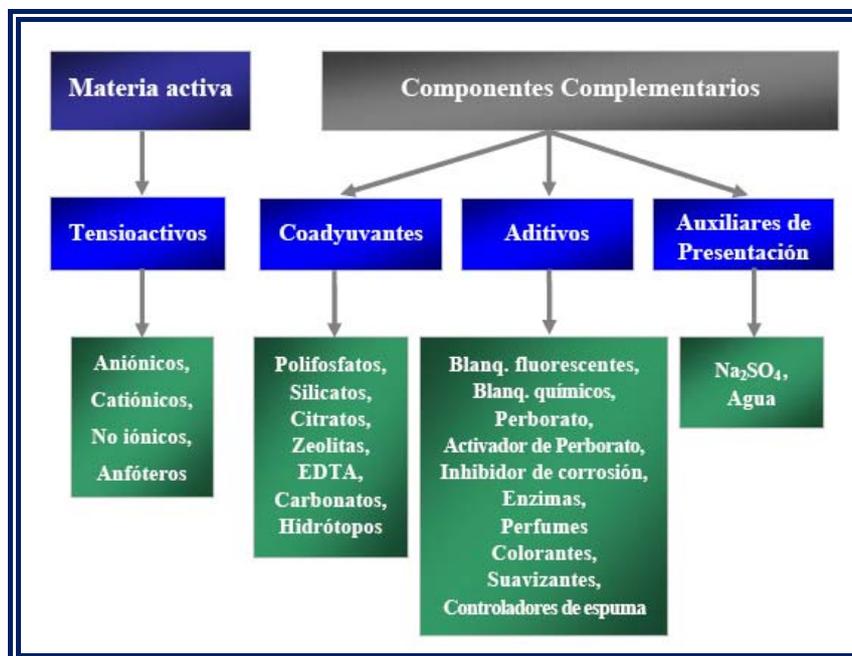


Figura 1.11- Componentes de formulaciones de detergentes.

1.6 - Los tensioactivos y el ambiente

1.6.1 - Concepto de Biodegradación

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 ambientales, que convierten, a través de diferentes procesos químicos, la materia orgánica compleja en compuestos inorgánicos más simples, que pueden ser utilizados como nutrientes y generar energía.

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*).

Actualmente, hay una extensiva base de datos referente a la biodegradación del de los tensioactivos en diferentes condiciones ambientales. 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 orgánicas¹¹. Para verificar la mineralización de estas sustancias, fueron estipulados algunos parámetros no específicos: consumo de O₂, eliminación del carbono orgánico y formación de CO₂^{12,13,14,15}. Sin embargo, existían dos factores que limitaban la extrapolación de estos estudios en relación a sus respectivos comportamientos reales (en el ambiente): los ensayos no se realizaron bajo las condiciones físicas, químicas y biológicas encontradas en los compartimentos ambientales; y los ensayos realizados no tuvieron en cuenta algunos compartimentos ambientales como sedimentos, suelos, aguas de pozo, estuarios y océanos, que tienen una gran importancia en la biodegradación de los tensioactivos.

Para superar estas limitaciones, algunos trabajos científicos fueron realizados simulando las condiciones ambientales, empleando para tal

¹¹ OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Revised guidelines for testing chemical*. OECD. Paris, 1993.

¹² Fischer W.K., Gerike P., Holtmann W. *Biodegradation determinations via unspecific analyses (COD DOC) in coupled units of the OECD confirmatory test*. Water Res. 9; 1131-1135, 1975

¹³ Gerike P., Fischer W.K. *A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests*. Ecotoxicol. Environ. Safety 3; 157-173, 1979.

¹⁴ 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.

¹⁵ Larson R.J. *Evaluation of biodegradation potencial of xenobiotic organic chemicals*. Appl. Environ. Microbiol. 38; 1153-1161, 1979.

finalidad, la creación de un microcosmos tanto en el campo como en el laboratorio.

1.6.2 - Ecosistemas

- Ecosistemas aerobios

Una gran fracción de la biodegradación que ocurre en la Tierra se lleva a efecto en el suelo. Esta acción es, desde luego, una parte esencial del ciclo del carbón, nitrógeno y de otros compuestos. Los organismos muertos - animales, vegetales, o microorganismos- son convertidos en sus elementos constituyentes, haciéndolos, de esta forma, asequibles para ser reutilizados por los organismos vivos. El suelo, con los organismos asociados, es considerado un importante agente degradador, siempre y cuando, se mantengan las condiciones aerobias, las cuales son esenciales para que se produzca la biodegradación.

Varios autores estudiaron la degradación de los tensioactivos en el sistema suelo, utilizando sistemas a escala de laboratorio^{16,17}.

La biodegradación de los tensioactivos aniónicos en medios acuáticos y terrestres es llevada a cabo, esencialmente, por microorganismos, de acuerdo con la siguiente reacción:

¹⁶ Klein S.A., McGuahey. *Fate of detergents in septic tank system and oxidation pond. Sanitary Engineering Research Laboratory. Report 64.* Universidad de California, Berkeley, 1964.

¹⁷ Rizet M., Mallevalle J., Cournarie J.L. *Pilot plant investigation of the evolution of various pollutants during artificial recharge of an aquifer by a basin.* Prog. Water Technol. 9; 203-215, 1977.



El carbono orgánico se utiliza en parte para la síntesis de nuevas células y para la producción de CO_2 , por tanto, la materia orgánica debería ser completamente degradada. Sin embargo, se ha observado que la velocidad de la reacción de oxidación disminuye conforme lo hace la concentración de sustrato, especialmente a bajas concentraciones, de tal forma que en el período de un ensayo de biodegradación no es posible eliminar el 100% de la materia orgánica. Este hecho queda reflejado en las normas para ensayos de biodegradación OECD, en las que se considera que un sustancia es fácilmente biodegradable si en un ensayo desaparece la sustancia a analizar en un 80% o más, en un tiempo de ensayo inferior a 24 horas. Esta decisión se basa en las inevitables diferencias que surgen en el estudio de la degradación de un compuesto, entre un medio natural y un reactor químico.

En cuanto a las bacterias capaces de degradar los tensioactivos, se aislaron muchas de ellas y algunos hongos. También, se usaron cultivos de laboratorio. Swisher¹⁸, 1987, citó cerca de 90 especies de bacterias y algunos hongos que se reproducían, y eran capaces de llevar a cabo al menos una degradación primaria de los tensioactivos.

En cuanto a las especies que más comúnmente se encuentran en el ambiente y que son capaces de degradar los tensioactivos, Swisher nombró a algunas pseudomonas y aerobacterias, que fueron aisladas junto con micrococcus y flavobacterias. Además, a esta lista hay que añadir la moraxella, la cual se asiló del lodo.

¹⁸ Swisher J. *Surfactants Biodegradation*. 2^o Ed. Marcell Dekker. New York, 1987.

Yoshimura¹⁹, 1984, aisló bacterias de lodos activos procedentes de ríos, encontrando especies como pseudomonas, necromonas y moraxella, las cuales eran capaces de degradar las cadena alquílica del LAS, pero no el anillo aromático, mientras que otras bacterias gram negativas no podían degradar el LAS, pero sí el anillo de los intermedios. En cambio, una mezcla binaria de estos dos tipos de organismos si fue capaz de degradar el 100% del LAS.

- Ecosistemas anaerobios

Existen varios tipos de sistemas anaeróbicos de origen natural (intestino humano, pantanos, marismas y arrozales, etc.), pero desde el punto de vista del comportamiento ambiental de los tensioactivos, los que más influencia tienen son:

- *Sedimentos de río y lagos:* Estos varían de totalmente aerobios en la superficie a totalmente anaerobios en la parte baja de su espesor total. Para los estudios toxicológicos llevados a cabo para los tensioactivos, la parte superior de las capas anóxicas, en la transición entre aeróbica y anaeróbica, es, con toda probabilidad, la más importante. En estas zonas, algunas de las sustancias químicas que han llegado a esa capa, entre ellas los tensioactivos, pueden volver a la cadena alimenticia, sirviendo de alimento a pequeños animales acuáticos que, posteriormente, lo serán de peces y otros animales superiores.

- *Suelos agrícolas:* Aunque son medios normalmente aerobios, ocasionalmente, son medios anóxicos, en donde la oxidación microbina de

¹⁹ Yoshimura K. *Adsorption and biodegradation of Las by microorganisms*. Journ. Com. Esp. Detg. 15; 103-121, 1984.

amoníaco a nitratos (nitrificación), y la reducción microbiana de nitratos a nitrógeno gas (desnitrificación), pueden estar teniendo lugar de manera simultánea, lo cual depende de las prácticas agrícolas empleadas, y de los cambios estacionales en la temperatura y en la saturación de agua. Los tensioactivos, especialmente los aniónicos, después de su proceso de depuración en plantas EDAR (estaciones depuradoras de aguas residuales), tienden a adsorberse en los lodos generados en la planta, los cuales, con posterioridad y después del secado, son usados para enmendar suelos agrícolas.

- *Sedimentos marinos:* Como en el caso de los sedimentos de las aguas superficiales, el agua sobrenadante y la capa superior de los sedimentos suele ser aeróbica, sin embargo, a medida que se va progresivamente aumentando la profundidad las condiciones van siendo cada vez más anóxicas. En muchas ocasiones la presencia de tensioactivos en sedimentos marinos es bastante frecuente, debido a que suelen ser desechados a las cuencas marinas después de ser tratados en las depuradoras o mediante vertido directo.

En cuanto a los sistemas anaeróbicos producidos por el hombre, el que tiene mayor relevancia para los tensioactivos es:

- *Digestión anaerobia de los lodos de aguas residuales:* Este método es ampliamente usado en las Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) para desodorizar, desinfectar, y estabilizar los lodos orgánicos pútridos, aumentando la purificación de las aguas residuales.

Las fermentaciones metanogénicas tienen lugar en grandes tanques agitados, calentados, hasta 35 °C, y que funcionan como reactores termostatzados de mezcla completa con tiempos de retención, generalmente, en el rango de 15 a 30 días.

Para tensioactivos su principal vía de eliminación es a través de las aguas de uso doméstico e industrial, las cuales pasan un proceso de depuración EDAR antes de su reutilización. Por tanto, la importancia de la digestión anaerobia, desde la perspectiva de los tensioactivos, es enorme, ya que su degradación completa depende, en gran parte, de su proceso de digestión anaerobio EDAR.

1.6.3 - El impacto ambiental de los tensioactivos

La principal aplicación de los tensioactivos, como se ha expuesto en la **Tabla 1.2**, es la formulación de detergentes. La gran variedad de los mismos²⁰, unido a su creciente consumo, da lugar a un aumento de sus incorporaciones a las aguas de los vertidos domésticos e industriales, ya que el consumidor, por ejemplo, elimina los detergentes a través de los sistemas domésticos de canalización de aguas residuales, existiendo un peligro potencial de afectar a la calidad de las aguas.

Los detergentes, al ser vertidos después de su uso, pueden terminar en varias matrices ambientales, bien a través de descargas directas (sin tratamiento) o después de tratamiento EDAR.

²⁰ Ash M., Ash I. *Handbook of industrial Surfactants (2vol)*. Synapse Information Resources, 2000.

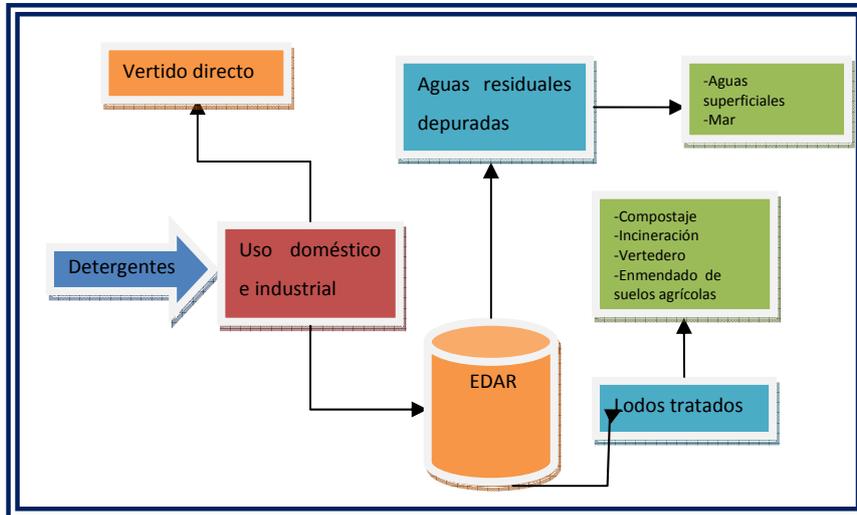


Figura 1.12- Emisión de los detergentes al medio.

Los problemas ambientales que puede provocar un detergente industrial, como consecuencia de su presencia en las aguas, pueden resumirse en:

- Aumento de pH de las aguas residuales a valores superiores a 12.
- Puede aumentar la presencia de niveles elevados de cloro y de compuestos organoclorados; algunos, posiblemente, de carácter tóxico y/o carcinógeno.
- Se requiere una cierta cantidad de oxígeno para degradar a los diferentes compuestos orgánicos que forman el detergente, lo que podría conducir a unas condiciones anóxicas peligrosas para las diferentes especies que habitan en el medio.

- Algunos de los compuestos de la formulación presentan efectos tóxicos, tanto sobre los microorganismos como sobre los organismos superiores que allí habitan.

- Efecto sobre la coagulación y sedimentación en las plantas depuradoras.

- Contaminación de aguas subterráneas, aunque no es muy frecuente y siempre como síntoma de otra contaminación más importante.

- Tienen tendencia a absorberse y a precipitarse, generando grandes cantidades ($\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en los lodos tratados, los cuales pueden ser usados en suelos agrícolas.

- En presencia de aguas con alto contenido en sales (aguas duras), los tensioactivos (aniónicos principalmente), tienden a precipitar, dando lugar a grandes acumulaciones de sales alcalino-térreas de estos compuestos en diferentes matrices medioambientales.

- Por todo lo anteriormente expuesto, desde los diferentes estamentos gubernamentales y científicos, se ha potenciado en las últimas décadas la formulación de detergentes con sustancias fácilmente biodegradables, así como el desarrollo de metodologías analíticas capaces de determinar los tensioactivos, en cualquiera de sus formas, en las diferentes matrices ambientales.

1.6.4 - Legislación ambiental

La evolución legislativa sobre los tensioactivos va íntimamente unida a la problemática que surge como consecuencia de su consumo y, entre otros, está muy influenciada por dos hechos ambientales 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, aparecieron de manera sucesiva distintas directivas, regulaciones y decisiones de obligado cumplimiento para todos los estados miembros. Estas normativas han ido resolviendo los problemas ambientales 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.

Por motivos de claridad y racionalidad, dichas normas en 2004 fueron actualizadas y refundidas en un sólo texto: **Reglamento (CE) N° 648/2004**²¹, 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, dicho 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,

²¹ 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). Bruselas, 2004.

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**²², de 21 de junio de 2006.

2.- TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS: JABÓN Y SULFATO DE ALQUILBENCENO LINEAL (LAS)

2.1 - Descripción y propiedades del LAS y el jabón

2.1.1 - Descripción, propiedades físicas y químicas del LAS

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 (-SO₃⁻) 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. Para mantener la neutralidad de la molécula el LAS suele tener, desde un punto de vista comercial, como contraión el catión Na⁺.

²² CEE. *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)*. Bruselas, 2006.

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. La distribución en homólogos de la muestra suele seguir la siguiente relación molar²³: C₁₀:C₁₁:C₁₂:C₁₃=13:30:33:24, siendo la media en carbono de 11.6, y con un contenido en 2-fenil (2Ø) isómeros entre 18 y el 29%^{24,25,26,27}. A su vez, cada homólogo es una mezcla de isómeros, 20 en total, los cuales surgen en función de la distinta posición en la que el anillo bencénico está unido a esta cadena lineal.

A pesar de esta diversidad, existen una serie de patrones de composición bien definida para el *LAS*. Dependiendo del proceso de síntesis del *LAB*, el precursor del *LAS*²⁰, la cantidad de sulfonato de alquilbenceno lineal suele variar entre 93% y el 98%. Del mismo modo, se suele encontrar entorno al 5% de mono-metil sulfonato de alquilbenceno (iso-*LAS*)²⁸. Las tetralinas sulfonadas (DATS) suelen aparecer en una proporción algo menor al 5%²⁹.

²³ Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products (HERA). *Linear Alkyl Benzene Sulphonate (LAS)*, 2007.

²⁴ Feijtel T.C.J., Mathijs E., Rottiers A., Rijs G.B.J., Kiewiet A., de Nijs A. *AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. Part 1: LAS monitoring study in "de Meer" STP and receiving river "Leidsche Rijn"*. Chemosphere 30; 1053-1066, 1995.

²⁵ Feijtel TCJ, Van de Plassche, (1995). *Environmental risk characterization of 4 mayor surfactants used in the Netherlands. RIVM/NVZ*, Report No. 679101025.

²⁶ Cavalli L., Clerici R., Radici P., Valtorta L. *Update on LAB/LAS*. Tenside Surf. Det. 36; 254-258, 1999.

²⁷ Valtorta L., Radici P., Calcinai D., Cavalli L. *Recent development of LAB/LAS*. Riv. It. Sostanze Grasse LXXVII: 73-76, 2000.

²⁸ Nielsen A.M., Britton L.N., Beall C.E., Russel G.L. *Biodegradation of coproducts of commercial LAS*. Environ. Sci. Technol. 31; 3397-3404, 1997.

²⁹ ECOSOL. *Statistics*. Brussels, 2005.

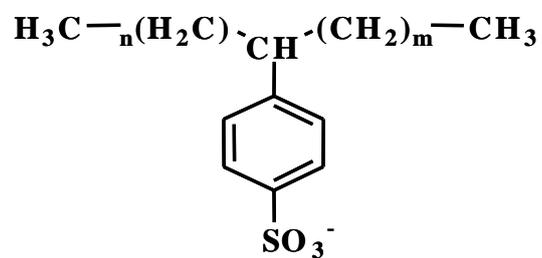


Figura 1.13- Ejemplo de molécula del LAS-Na.

En la **Tabla 1.3**, se muestran las propiedades físicas y químicas del LAS comercial ($\text{C}_{11.6}$)³⁰

³⁰ SIDS. *Assessment report on LAS*. Sponsor country: USA, 2005.

Tabla 1.3- Propiedades físicas y químicas del LAS.

LAS	PROTOCOLO	RESULTADOS
Descripción molecular	Sal sódica del ácido orgánico	-
Peso Molecular [$\text{g}\cdot\text{M}^{-1}$]	$(\text{C}_{11.6}\text{H}_{24.2})\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$	342.4
Presión de vapor a 25°C	Calculada como C_{12}	$(3-17) \cdot 10^{-13}$
Punto de ebullición [°C]	Calculada como C_{12}	637
Punto de fusión [°C]	Calculada como C_{12}	277
Coefficiente de partición Octanol:agua [log10]	Calculada como $\text{C}_{11.6}$	3.32
Concentración miscelar crítica (C.M.C.) [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Experimental	0.65
Solubilidad en agua [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Experimental	250
Densidad [$\text{Kg}\cdot\text{L}^{-1}$]	Experimental relativa	1.06
pH (5% LAS en disolución acuosa)	Experimental	7-9
Constante de Henry [$\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$]	Calculada como C_{12}	$6.35 \cdot 10^{-3}$

2.1.2 - Descripción del jabón

Según la Real Academia de la Lengua se define jabón³¹ como " Pasta que resulta de la combinación de un álcali con los ácidos del aceite u otro cuerpo graso. Es soluble en el agua, y por sus propiedades deterSORIAS sirve comúnmente para lavar". Del mismo modo, la Academia diferencia entre dos tipos de jabón:

³¹ Página web del Diccionario de la Real Academia Española:
http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=jabon

Jabón blando: "Aquel cuyo álcali es la potasa y que se distingue por su color oscuro y su consistencia de ungüento".

Jabón duro: "Aquel cuyo álcali es la sosa, y se distingue por su color blanco o jaspeado y su mucha consistencia".

El jabón, por tanto, son sales de metales alcalinos (sodio y potasio) de ácidos carboxílicos, los cuales están comprendidos en un rango de cadena carbonada entre C_{12} - C_{22} .

Desde un punto de vista práctico, los ácidos grasos más importantes para la formación del jabón comercial son: C_{12} (dodecil) ácido saturado; C_{14} (mirífico) ácido saturado; C_{18} (esteárico) ácido saturado; $C_{18:1}$ (oleico) ácido monoinsaturado. En la **Figura 1.14**, podemos ver la estructura de estos compuestos.

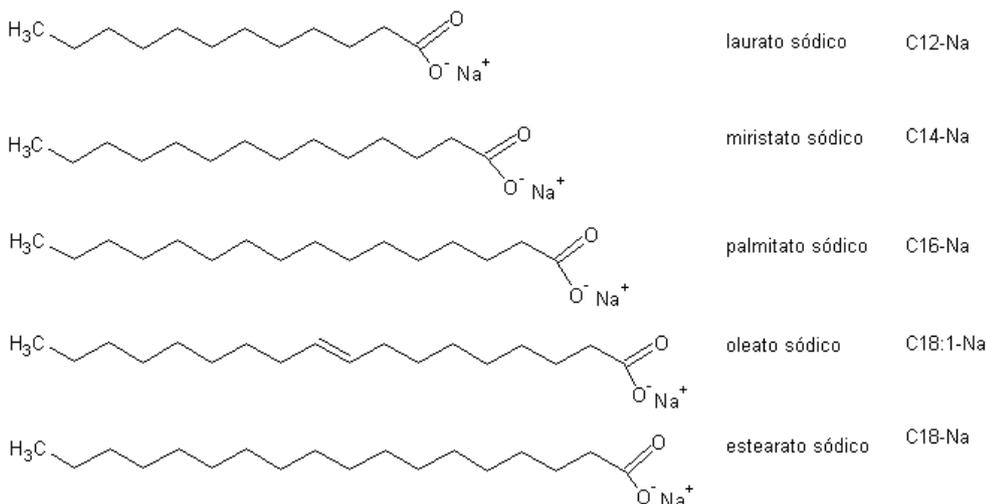


Figura 1.14- Estructura de las sales sódicas de los ácidos grasos.

2.1.3 - Propiedades físicas y químicas del jabón³²

Las propiedades físicas y químicas generales difieren sensiblemente, dependiendo del tipo de jabón. Por lo tanto, para un mejor estudio, en las siguientes tablas, se describen por separado las propiedades del jabón sódico y del cálcico.

Tabla 1.4- Propiedades físicas y químicas del jabón sódico.

	C ₁₂ -Na	C ₁₄ -Na	C ₁₆ -Na	C ₁₈ -Na	C _{18:1} -Na
Peso molecular [g·mol ⁻¹]	223	250.4	278.4	306.4	304.5
Punto de fusión [°C]	217	227	238	250	251
Punto de ebullición [°C]	508	532	555	578	582
Presión vapor a 25°C [Pa]	2.0E ⁻⁸	3.9E ⁻⁹	7.3E ⁻¹⁰	1.3E ⁻¹⁰	1.7E ⁻¹⁰
Coefficiente de partición Octanol:agua [log10]	1.2	2.2	3.2	4.1	3.9
Punto de Kraft [°C]	21.5	39	69	77	-
C.M.C [g·mol ⁻¹]	5.8	2.6	1.1	0.56	-

³² Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products (HERA). *Fatty acids metals (Soaps)*, 2003.

Tabla 1.5- Propiedades físicas y químicas del jabón cálcico.

	C ₁₂ -Ca	C ₁₄ -Ca	C ₁₆ -Ca	C ₁₈ -Ca	C _{18:1} -Ca
Peso molecular [g·mol ⁻¹]	240.4	268.5	296.5	324.6	322.6
Punto de fusión [°C]	81.1	98.9	116	132	132
Punto de ebullición[°C]	308	335	358	382	385
P. vapor a 25°C [Pa]	0.05	7.7E ⁻³	1.4E ⁻³	2.6E ⁻⁴	2.2E ⁻⁴

Según se observa, a medida que va aumentando la cadena alquílica, también se ve incrementado el punto de fusión y el punto de ebullición de manera proporcional al peso molecular, pero, sin embargo, va disminuyendo la presión de vapor. Por otro lado, la insaturación, C_{18:1}, no afecta de manera notable en las propiedades, siendo muy similar a las obtenidas para el homólogo saturado. Por el contrario, si comparamos los dos tipos de jabón, podemos observar diferencias significativas en todas las propiedades, ya que el punto de fusión y de ebullición tiene valores más elevados para el caso del jabón tipo sódico; en cambio, la presión de vapor calculada es mayor para el jabón tipo cálcico.

Una mención aparte requiere el estudio de la solubilidad, ya que esta propiedad es la principal causa estudiada que determina el comportamiento del jabón desde un punto de vista ambiental y de aplicación.

Los jabones sódicos saturados son solubles en agua, el jabón C₁₈-Na se disuelve muy lentamente, y el jabón insaturado C_{18:1}-Na es soluble en agua. El jabón de sales sódicas es mucho más soluble que el de sales

cálcicas. Por debajo de pH 7 el jabón es insoluble en agua, debido a la formación del ácido graso libre insoluble en agua.

Hay pocas medidas de datos para la solubilidad en agua. La variación de la solubilidad con la longitud de la cadena no es intuitiva. Por ejemplo la sal de sodio del ácido graso C_{16} tiene un valor de $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), mientras que la sal equivalente de la cadena de C_{18} es $50000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (a $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Por intuición estos valores son mucho más altos que los esperados, ya que como la longitud de cadena aumenta, se esperaría que la solubilidad disminuyera. Sin embargo, las referencias encontradas muestran una tendencia diferente³³.

Tabla 1.6- Solubilidades de los jabones sódico.

JABÓN	SOLUBILIDAD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) $20 \text{ }^\circ\text{C}$
$C_{12}\text{-Na}$	22000
$C_{14}\text{-Na}$	-
$C_{16}\text{-Na}$	2000
$C_{18}\text{-Na}$	50000
$C_{18:1}\text{-Na}$	100000 (12°C)

Es posible que el efecto del punto de Krafft (T_K) y los valores de concentración micelar crítica (C.M.C.) expliquen algunas de estas observaciones. El punto de Krafft se define como la temperatura a la cual la solubilidad del surfactante es igual a la C.M.C., y se caracteriza por un aumento rápido de la solubilidad por encima de esta temperatura. Si se tiene en cuenta los valores de del punto de Krafft mostrados en la **Tabla**

³³ Stephen, H., Stephen, T. *Solubilities of inorganic and organic compounds*. Pergamon Press NewYork, 1963.

1.3, se puede explicar la alta solubilidad del jabón sódico de cadena C_{12} , ya que su punto de Krafft es de $21.5\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, no se puede concluir lo mismo para el jabón de cadena más alta (C_{16} y C_{18}), debido a que presentan una gran solubilidad, pero un alto punto de Krafft.

En 1992, *Clint*³⁴, basándose en estudios previos, justificó este anómalo comportamiento. Según *Clint*, el causante de los altos puntos de Krafft para el jabón de cadena larga era el exceso de iones OH^- y Na^+ , los cuales se obtenían de la síntesis del mismo; ya que se había demostrado que la presencia de iones hacía subir el punto de Krafft³⁵.

A pesar de todos estos estudios, sigue sin justificarse con claridad la solubilidad del jabón sódico, debido a que, experimentalmente, es más complicado disolver un jabón sódico de cadena larga que un homólogo más corto.

Menos ambigüedad hay a la hora de explicar las solubilidades del jabón tipo cálcico y magnésico, ya que, según *Weast*³⁶, su comportamiento es más intuitivo.

³⁴ Clint J.H. *Surfactant Aggregation*. Blackie, Glasgow and London, 1992.

³⁵ Hato M., Tahara M., Suda Y. *Colloidal properties of aqueous bivalent metal dodecylpoly (oxyethylene) sulphates and hexadecyl(oxyethylene)sulphate*. J. Coll. Interface. Sci 72; 458, 1979.

³⁶ Robert C. Weast. *Handbook of Chemistry and Physics*. The Chemical Rubber C.O. 1969-1970 50th edition.

Tabla 1.7- Solubilidades de los jabones cálcicos.

JABÓN	SOLUBILIDAD (mg·L⁻¹) 20 °C
C ₁₂ -Ca	8.7
C ₁₄ -Ca	0.57
C ₁₆ -Ca	0.037
C ₁₈ -Ca	0.0023
C _{18:1} -Ca	40 (25 °C)

Tabla 1.8- Solubilidades de los jabones magnésicos.

JABÓN	SOLUBILIDAD (mg·L⁻¹) 20 °C
C ₁₂ -Mg	70 (25 °C)
C ₁₄ -Mg	60 (15 °C)
C ₁₆ -Mg	80 (25 °C)
C ₁₈ -Mg	30 (15 °C)
C _{18:1} -Mg	240 (25 °C)

Según los datos referidos, a medida que va aumentando la cadena alquílica el jabón se va haciendo más insoluble, con la excepción del jabón con insaturación, el cual es más soluble. Por otro lado, el jabón cálcico presenta una menor capacidad a ser disuelto que el magnésico.

2.1.4 - Capacidad detergente del jabón y del LAS

La capacidad detergente del jabón y del LAS radica en su elevado poder de humectación, emulsificación y dispersión.

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 jabón y del *LAS* es un aspecto muy importante 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*”³⁷ 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 dicho proceso consta de cuatro fases:

- En la primera fase el tensioactivo (jabón o *LAS*) es adsorbido por la película de grasa y por el sustrato.

³⁷ Berth P., Jeschke P. *Consumption and fields of application of LAS*. Tenside Surf. Det. 26; 75-79, 1989.

- En la segunda, la película de grasa se reduce hasta adquirir forma de gotas bajo la influencia del tensioactivo, manteniéndose su adsorción tanto en la superficie del tejido como sobre las gotas así formadas.
- 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 agente detergente 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.

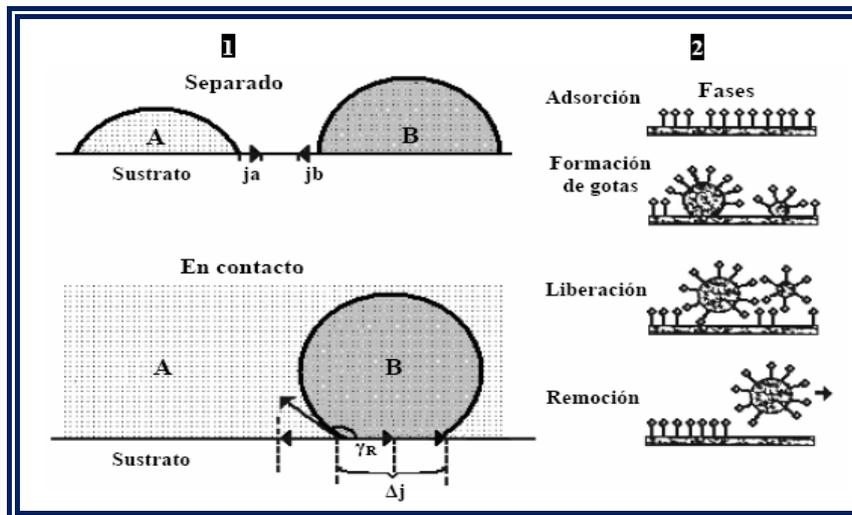


Figura 1.15- 1: Esquema del fenómeno de “rolling up” producido cuando la disolución del tensioactivo en medio acuoso (A) y el residuo aceitoso (B) entran en contacto. 2: Esquema de las diferentes fases del proceso.

El jabón y el *LAS* poseen una propiedades emulsionantes muy elevadas, incluso a bajas concentraciones.

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 tensioactivo sobre las diferentes superficies. Como consecuencia de este proceso de carga y adsorción, los potenciales interfaciales (potenciales zeta $-\zeta$ -) 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.

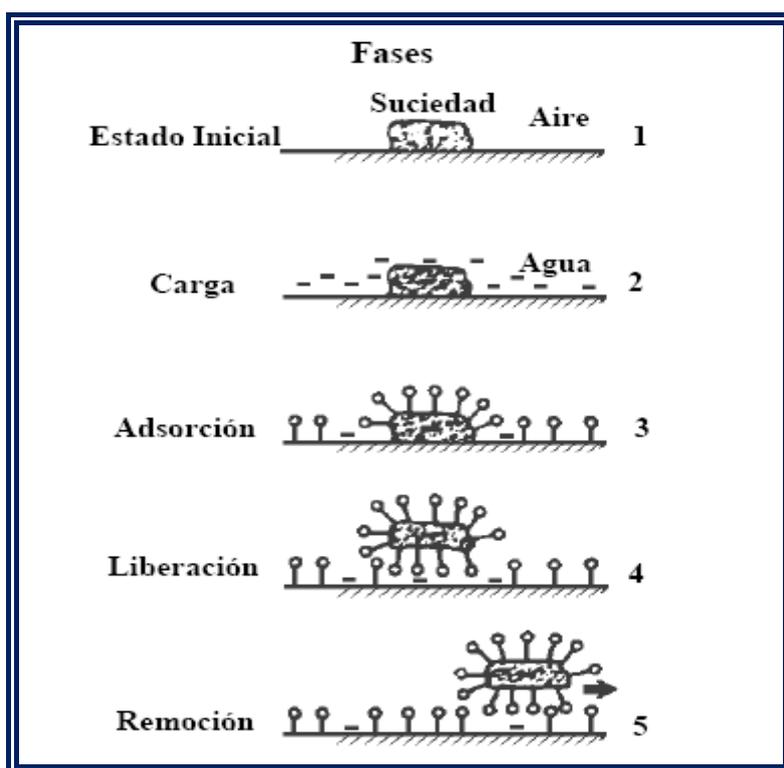


Figura 1.16- Eliminación de una partícula sólida.

2.2 - Síntesis

2.2.1 - Síntesis del LAS

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, y tras su neutralización, el sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS).

- Obtención de la 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 CEPSA QUÍMICA (principal productor mundial de LAB, en su planta de San Roque-España) para la obtención de n-parafinas de rango C₁₀ - C₁₄, se basa en el proceso Molex de *Universal Oil Products (UOP)*, donde el queroseno es sometido a un hidrotratamiento para eliminar impurezas, especialmente azufre, que puede ocasionar daños en los tamices moleculares, para posteriormente, realizar la extracción de las n-parafinas mediante un proceso de adsorción selectiva sobre tamices moleculares.

Todas la n-parafinas obtenidas por este procedimiento son de alta pureza (alrededor del 98 - 99%). Por este motivo, son productos que se pueden utilizar como disolventes en una gran cantidad de aplicaciones.

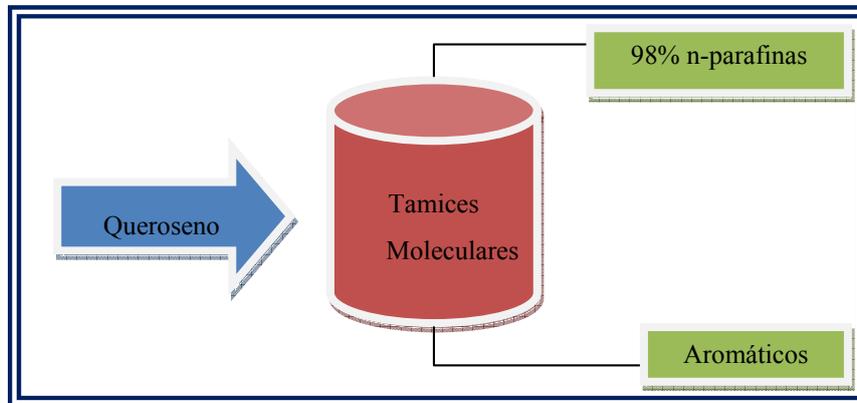


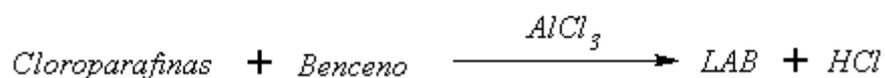
Figura 1.17- Proceso de la extracción de parafinas simplificado.

- Síntesis del alquilbenceno lineal (LAB)

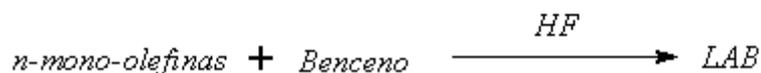
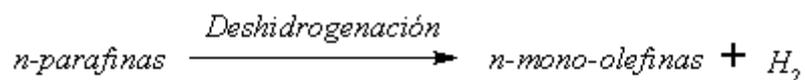
Una vez obtenidas las parafinas, éstas son sometidas a una reacción de alquilación. Para ello existen, principalmente, tres alternativas para su síntesis, que difieren en el tipo de catalizador ácido usado y en el reactivo a alquilar, siendo mono-olefinas en algunos casos y cloroparafinas en otros.

Cabe destacar, que durante el proceso de formación de los derivados olefínicos, la posición del doble enlace o de la cloroparafina generada es aleatoria, dando lugar a un abanico de isómeros, los cuales caracterizaran al LAB y, por ende, al LAS.

En la **Figura 1.18**, se muestran los procesos más usados para la obtención del LAB.

1. Proceso $AlCl_3$:

2. Proceso HF:



3. Proceso DETAL

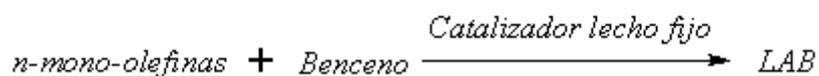
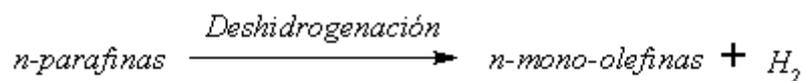


Figura 1.18- Proceso de síntesis del LAB.

El proceso DETAL fue creado por CEPASA-QUÍMICA y UOP en la década de los 90. 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.

- Síntesis del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS)

Más del 98% del *LAB* producido es convertido, después de sulfonarlo, en el correspondiente ácido sulfónico. Inicialmente se empleaba óleum (ácido sulfúrico fumante) así como ácido sulfúrico como agentes sulfonantes tanto en reactores en discontinuo como en el llamado “sistema de cascada”.

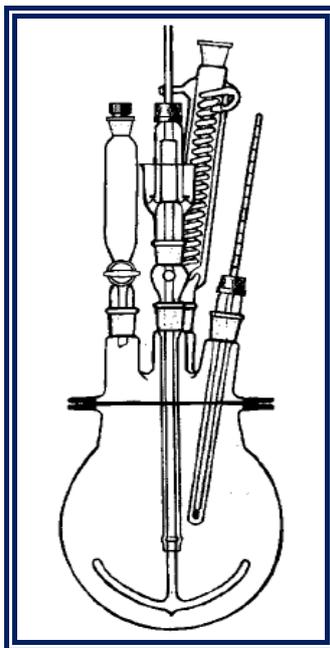


Figura 1.19- Esquema de la sulfonación con oleum.

En las plantas industriales modernas, el proceso de sulfonación del *LAB* se ha mejorado considerablemente con el empleo de reactores de película descendente (*FFR*, del inglés *Falling Film Reactors*), donde se añaden los

reactivos (SO_3 y el *LAB*), el cual es seguido por un proceso de digestión y, para completar la reacción, de un hidrolizador. Durante la reacción de sulfonación el grupo $-\text{SO}_3$ es introducido en la posición *para* del anillo bencénico del *LAB*.

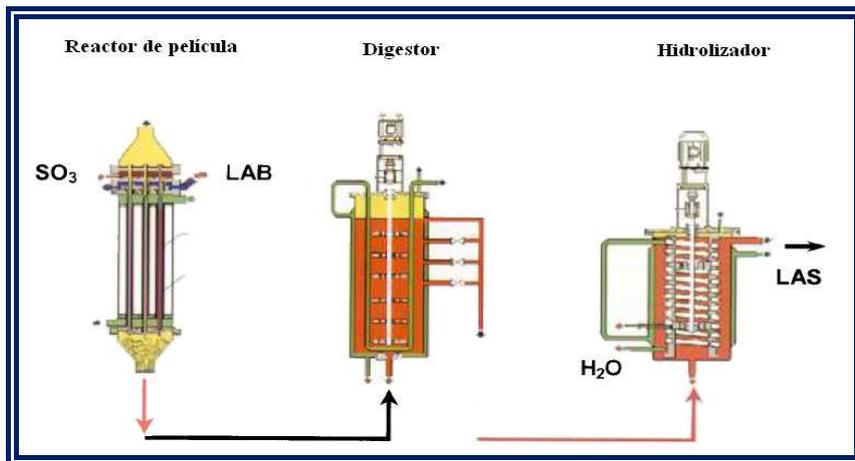


Figura 1.20- Etapas del proceso de sulfonación.

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

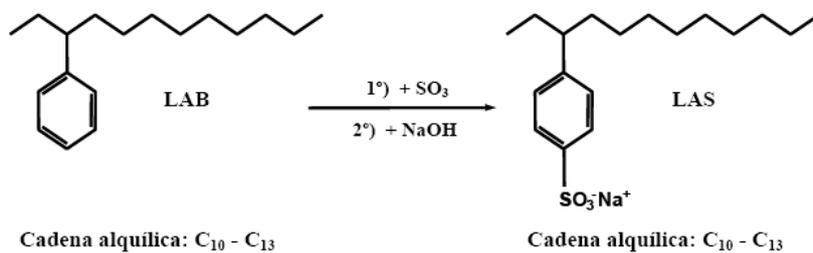


Figura 1.21- Esquema del proceso de síntesis del *LAS*.

2.2.2 - Síntesis del jabón

El jabón se compone de las sales de sodio (o de potasio) de ácidos grasos de 12 a 18 átomos de carbono. Las sales de sodio fabricadas en grandes cantidades es el jabón duro. Por otro lado, el jabón generado mediante las sales potásicas se denomina jabón blando. Ambos, se obtienen saponificando grasas o aceites, o neutralizando ácidos grasos con hidróxido o carbonato de sodio o de potasio.

La mejor clasificación del jabón se basa en el uso para los que ha sido fabricado. El de mejor calidad es el jabón de tocador, que contienen muy poco álcali, en el cual se utiliza para su síntesis grasa y aceite de color mucho más claro. El que le sigue en calidad es el jabón de servicio ligero, que se presta en forma de pastillas, polvos, gránulos y escamas. Este último se usa para lavar la vajilla, tejidos de lana, etc. En este caso se usan grasas con un color un tanto más oscuras.

Las grasas más oscuras se emplean en la fabricación de jabón para el lavado de ropa en el hogar doméstico. Existen, también, el jabón industrial, el cual se fabrica para fines específicos.

- Método básico de fabricación³⁸.

La mayor parte del jabón se fabrica por uno de los dos métodos básicos siguientes:

³⁸ <http://www.textoscientificos.com/jabon>

1. Saponificación de grasas y aceites.
2. Neutralización de ácidos grasos.

El más utilizado es el primero porque el equipo requerido para obtener productos de buena calidad es relativamente sencillo y poco costoso. La producción y manipulación de ácidos grasos requiere metales resistentes a los ácidos, caros y difíciles de conseguir. Por ello, resulta más fácil fabricar jabón de alta calidad con grasas y aceites neutros, antes que instalar equipos especiales para hacer jabón.

- Composición y caracteres del jabón

La reacción química que se verifica en la fabricación del jabón de grasas y aceites neutros (triglicéridos) se expresa en la forma siguiente:

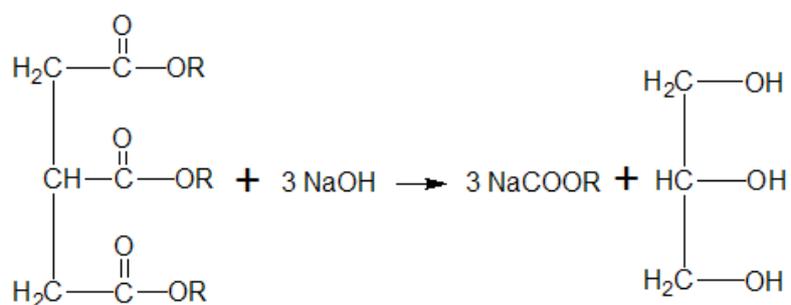
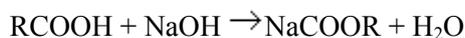


Figura 1.22- Síntesis del jabón.

La glicerina se aprovecha como subproducto. La cantidad de NaOH requerida para saponificar una cantidad dada de grasa neutra se calcula por el índice de saponificación de la grasa, el cual se expresa como el

número de miligramos de KOH (a base de 100%) necesarios para saponificar un gramo de grasa. El índice de saponificación se multiplica por el factor 0.715 para obtener el número necesario de miligramos de NaOH.

En la neutralización de los ácidos grasos, la reacción química se expresa de la siguiente forma:



En esta última reacción no se forma glicerina.

- Materias Primas

En la fabricación del jabón, los caracteres físicos y químicos del producto dependen directamente de las materias primas empleadas. De las grasas y aceites se emplean el sebo, la manteca, aceite de nueces, los residuos de la refinación y del endurecimiento de aceites de semilla y algunos aceites marinos.

➤ *Álcalis*. En la mayor parte del jabón se utiliza el NaOH como álcali saponificador o neutralizante. En el procedimiento ordinario para hacer jabón se usa el cloruro de sodio en grandes cantidades para precipitar el jabón de su solución en la lejía (fase acuosa).

Los jabones potásicos, que se hacen empleando como álcali la potasa cáustica, son más solubles en agua que los de sodio. No pueden precipitarse de la lejía por el cloruro de sodio, ya que se formaría jabón sódico.

Las combinaciones de las dos clases de jabón tienen las deseables características del jabón duro, más la rápida solubilidad y la facilidad de formar gran cantidad de espuma, peculiar del jabón blando.

➤ *Grasas y Aceites.* Los ácidos grasos más convenientes en el jabón son el láurico, el mirístico, el palmítico y el oleico, que contienen de 12 a 18 átomos de carbono. Es evidente que los caracteres del jabón están directamente relacionados con los ácidos grasos de las materias primas utilizadas.

Los ácidos mencionados anteriormente son saturados, excepto el oleico, y estos forman la mayor parte de la materia del sebo y del aceite de coco. Este aceite y el sebo, en relaciones de 3:1 y 4:1, se utilizan en la mayoría del jabón fabricado para lavanderías y para el tocador. Las fórmulas dependen de la calidad deseada sobre el producto terminado.

➤ *Sebo.* El sebo se utiliza en la fabricación de jabón en mayor cantidad que cualquier otra grasa. Se obtiene fundiendo grasas de ganado vacuno, lanar, caballo, etc., y se clasifica en dos grados comerciales: comestible y no comestible. La mayor parte del sebo utilizado es no comestible.

Los sebos se clasifican por el American Institute of Meat Packers según su color, porcentaje de ácido graso libre y contenido de humedad, contenido de materia insoluble y contenido de materia insaponificable.

El título del sebo crudo es un factor importante para determinar la calidad del sebo y la dureza del jabón que éste producirá. El título se define como el punto de solidificación de los ácidos grasos contenidos en el sebo,

expresado en grados centígrados. Una grasa cuyo título excede los 40 °C, se clasifica como sebo, y hasta 40 °C se considera como grasa o manteca. El contenido de humedad, materia insoluble y materia insaponificable es material que no produce jabón. El sebo de alto título produce jabones duros y el de título bajo, jabones blandos.

➤ *Grasa.* La grasa o manteca ocupa el segundo lugar en importancia entre las materias grasas utilizadas para producir jabón. La grasa pocas veces se utiliza sola en las calderas de saponificación; generalmente se utiliza combinada con el sebo. El jabón hecho con manteca es algo más blando que el fabricado con sebo, y no tienen el olor y la estabilidad peculiares del fabricado con sebo. La manteca contiene mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados que el sebo.

➤ *Aceites.* Estos aceites, a saber: de coco, de palma, marinos, de oliva, de cacahuete, de maíz, o de sésamo, se utilizan combinados con las grasas ordinarias utilizadas en la fabricación de jabón. Se utilizan para jabón especiales con propiedades distintas a las del jabón común. Este jabón no tiene mucha salida, debido a que es muy caro por las materias primas utilizadas.

➤ *Materiales no grasos.* Las principales no grasas son: la colofina, el aceite de pino y ácidos nafténicos. Estos materiales no grasos no son triglicéridos, y por consiguiente no se forma glicerina cuando se transforman en jabón. Este jabón se mezcla en pequeñas cantidades con el jabón ordinario para el uso en lavanderías y jabón industrial.

Tabla 1.9- Composición media de aceites y grasas (valores en %).

ACEITE	C ₈ -C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Coco	15	48	18	8	2	6	2	-
Maíz	-	-	-	12	2	28	57	1
Oliva	-	-	8	2	83	6	-	-
Almendra	6	50	18	9	2	13	1	-
Soja	-	-	11	3	23	53	8	-
Sebo (vaca)	-	-	6	29	19	44	2	-
Sebo (carnero)	-	-	5	25	30	36	4	-

- Tratamiento de Grasas y Aceites

Las grasas y los aceites utilizados en la fabricación del jabón se transportan en barcos, camiones-tanques, tambores metálicos. Al ser recibidos en las fábricas o áreas de almacenamiento, las grasas y aceites solidificados se funden por calentamiento con serpentines de vapor cerrados y se bombean a los tanques de almacenaje. Estos tanques tienen el fondo en forma cónica para la sedimentación del exceso de humedad y de los materiales insolubles.

El tratamiento de las materias primas después de la sedimentación depende del jabón que se intenta producir, y del tiempo que están almacenadas antes de la saponificación. Pueden ser refinadas y blanqueadas antes de bombearlas a la caldera del jabón.

Es muy importante, al almacenar las grasas y aceites para la fabricación del jabón, conservarlos tan secos como sea posible, para evitar su alteración por la hidrólisis. Como resultado de la formación de ácidos grasos libres durante la hidrólisis, se oscurece el aceite.

Una vez almacenado el sebo blanco se refina de nuevo y se blanquea antes de ser saponificado. El sebo de color se somete a cualquiera de los diversos tratamientos descolorantes. El aceite de coco se refina y blanquea si ha de ser usado para obtener productos de alta calidad.

➤ *Proceso de Refinado*

La mayor parte de la materia prima se refina por medio de un álcali cáustico para mejorar la calidad. Las heces, es decir, los residuos de dicho proceso, que se asientan en el fondo del tanque, contienen algo de aceite neutro. Si la masa de residuos ha de ser convertida en ácidos grasos, se saponifica el aceite neutro y luego se hidroliza la masa para liberar los ácidos grasos.

➤ *Blanqueo*

Terminada el proceso de Refinado, la materia grasa se blanquea con una tierra absorbente para producir un jabón de “caldera” o de color blanco. El blanqueo puede hacerse en vasija abierta bajo presión atmosférica, o en tanque cerrado a vacío. Es mejor el método al vacío porque quita el olor a la materia grasa a la vez que la blanquea. La materia grasa blanqueada se filtra en prensas-filtros de placas y se almacenan para el posterior suministro.

➤ *Hidrogenación*

Las grasas blandas y los aceites marinos, compuestos de glicéridos, con elevado contenido de ácidos grasos insaturados, pueden ser mejorados por hidrogenación. La hidrogenación elimina olores desagradables y endurece la materia grasa.

• Fabricación de jabón

La fabricación de jabón puede hacerse por método de tareas (intermitente) o por método continuo. La elección del procedimiento y de las materias primas depende de la calidad que se quiera obtener, de la instalación para el manejo, del tratamiento de las materias primas y de los medios para producir el jabón y recuperar la glicerina.

La mayor parte de las fábricas de jabón operan con el método de *Calderas de plena cocción* (intermitente) utilizando materias grasas neutras. Con dicho procedimiento se produce un jabón de alta calidad.

Las principales objeciones que se oponen a los métodos continuos de fabricación de jabones son:

- 1) No proporcionan la flexibilidad de operación que es posible obtener con la caldera.
- 2) Están muy mecanizados y requieren operarios especializados.

- 3) No permiten cambiar de una fórmula a otra sin rehacer cantidades sustanciales de jabón.
- 4) Consumen mucho tiempo en poner en movimiento y en para las unidades.

➤ *Fabricación intermitente con materias grasas neutras:*

➤ *Método de la cocción total.* Dicho método consta de varias etapas u operaciones, mediante las cuales se efectúa la saponificación de las materias grasas, la precipitación del jabón en la lejía (o fase acuosa) de jabón concentrada, la separación de la glicerina y las materias coloreadas de la masa jabonosa por el lavado, y la cocción de acabado, al objeto de dar el punto a la masa, de manera que mediante reposo forme un jabón limpio.

La saponificación de la materia grasa debe hacerse con cierta rapidez, aunque regulada. La reacción es exotérmica y se realiza en la interfase aceite - agua. Al mezclarse el aceite/agua con el álcali cáustico, se produce el primer jabón, el cual emulsiona el aceite sin saponificar, y expone así grandes superficies de éste a la acción de la sosa cáustica. La saponificación avanza rápidamente cuando se ha formado cantidad de jabón suficiente para emulsionar todo el aceite.

Los ácidos grasos libres contenidos en el aceite inician la reacción antes que los glicéridos, ya que obran por simple neutralización. El jabón así formado es el agente emulsionante necesario para iniciar la saponificación del aceite neutro.

En este proceso suele agregarse la materia grasa al jabón sucio, la cual procede de un proceso anterior. El contenido de jabón de este jabón sucio basta para promover la rápida emulsión y saponificación de la nueva carga. Si los aceites o grasas muy refinados, que contienen poca cantidad de ácidos grasos libres o carecen de ellos, se echan en una caldera limpia, es difícil iniciar la saponificación. A veces se agrega una pequeña cantidad de jabón para facilitar la saponificación.

Durante la saponificación se añade NaCl a la caldera para producir grumos o gránulos. Como la sal es electrolito, reduce la solubilidad del jabón en la fase acuosa, por lo que el jabón se separa de la disolución. Esta precipitación del jabón se llama saladura o graneado del jabón. Manteniendo un grano blando en el jabón durante la saponificación, se evita el espesamiento de la masa con formación de nódulos duros, los cuales ocluyen grasas sin saponificar, dificultando la producción de un jabón de buena calidad.

En la caldera existen diversas formas físicas de jabón:

Jabón granulado: es un jabón grumoso precipitado de la fase acuosa por saladura o por la adición de sosa cáustica. El jabón con fórmula de producción distinta requiere de disoluciones de electrolitos de distinta fuerza iónica para originar el mismo tipo de grano.

Jabón limpio: es el producto acabado de la caldera de jabón. Contiene un 63% de total de ácidos grasos y cantidades pequeñas de Na₂O libre, NaCl y glicerina. El total de ácidos grasos es también influido por el tipo de acabado y la duración de la sedimentación después del acabado.

Jabón gomoso: es una disolución viscosa de jabón que se forma si el contenido de electrolito en la fase acuosa o lejía es inferior a cierto nivel. Este jabón es difícil de manejar por su alta viscosidad.

Jabón sucio: (o *jabón negro*): es una solución de color oscuro que contiene algo de jabón y que cae goteando de la masa de jabón después del acabado. Su color varía entre el gris y el negro según las impurezas que se sedimenten de la masa de jabón mientras ésta permanece en el estado de grano blando propio del acabado. Generalmente, el jabón sucio se une a la carga de una cocción subsiguiente para obtener un jabón de calidad igual o inferior.

En la cocción del jabón la relación de fase acuosa es muy importante, ya que está relacionada con la recuperación de la glicerina. Dicha relación se define como "las libras de lejía consumidas por libra de jabón limpio de 63% de total de ácidos grasos". A veces, se denomina relación de lejía a la relación entre la lejía gastada y la grasa saponificada. Generalmente, se mantiene baja la relación para evitar el costo de evaporar gran cantidad de agua de las lejías glicéricas, y el manejo de cantidades grandes de sal recuperada.

➤ *Método continuo con materias grasas neutras.*

En los últimos años, se han instalado en todo el mundo fábricas de jabón basadas en el proceso continuo. Las fases básicas de fabricación son análogas a las operaciones que se realizan en el método de caldera.

Se opera en contracorriente, y el número de lavados depende de la cantidad de glicerina que ha de ser recuperada del jabón. Normalmente, se suelen utilizar dos métodos:

Método de Sharples. En este método se usan centrifugas de gran velocidad para separar la lejía del jabón.

Método Mon Savon. Este método se aplica a la manufactura continua de jabón pulido con materias grasas neutras.

➤ *Fabricación de Jabón con ácidos grasos.*

Los ácidos grasos se obtienen por hidrólisis de las grasas y aceites naturales. Los productos de la hidrólisis son ácidos grasos y agua que contiene la glicerina. Pueden utilizarse ácidos grasos destilados para la fabricación de jabón especial. Los ácidos grasos sin destilar se emplean para obtener jabón de uso industrial.

La neutralización de los ácidos grasos para transformarlos en jabón se realiza con carbonato de sodio o hidróxido sódico, pudiendo hacerse en continuo o intermitentemente.

Método Continuo.

Por la facilidad con que los ácidos grasos se combinan con la sosa cáustica para formar jabón, se usa comúnmente el método continuo de saponificación. Cantidades de ácidos grasos calientes y de disolución caliente de hidróxido sódico, exactamente proporcionadas, se juntan en un aparato mezclador de gran velocidad. La concentración de la disolución

de soda cáustica es tal, que el jabón tendrá el deseado contenido de humedad. La reacción se verifica rápidamente y el jabón producido se descarga en un tanque que es mantenido en agitación. Se hecha en el tanque cloruro sódico para producir jabón limpio con el deseado contenido de electrolito. Se hacen ensayos analíticos con el jabón de este tanque y se realizan los ajustes necesarios antes de bombear el jabón limpio a los tanques de elaboración.

Método Intermitente.

Se utilizan las calderas ordinarias. El carbonato sódico neutraliza el grueso de la carga de ácidos grasos y con el hidróxido sódico se hace el ajuste final, pero también puede hacerse la neutralización entera con sosa cáustica. En la práctica, se calienta en la caldera hasta ebullición la disolución de carbonato sódico, y se incorporan bombeándoles lentamente, los ácidos grasos fundidos. La neutralización se verifica inmediatamente con desprendimiento de gas carbónico. Terminada la reacción, se “granea” el jabón con hidróxido sódico o con cloruro sódico y se deja sedimentar la fase acuosa. Esta disolución se extrae por el fondo de la caldera y se hace el acabado del jabón como en el método de la caldera con materias grasas neutras.

2.3 - Consumo y aplicaciones

2.3.1 - Consumo y aplicaciones del LAS

El consumo mundial del LAS en el año 2005²³ fue de 2.5 millones de toneladas, con una proyección de consumo de cerca de 3.4 millones de toneladas para el año 2010³⁹. Estas cifras ponen de manifiesto que el LAS⁴⁰ es uno de los tensioactivos más utilizado en el mercado mundial de detergentes aniónicos, justo después del jabón.

En cuanto al consumo total en Europa Occidental, su producción registró un valor de 360 Kilotoneladas (Kton) en el año 2005²³.

Desde el punto de vista de las aplicaciones, el LAS es utilizado, principalmente, en forma de sales sódicas y, ocasionalmente, potásicas, amónicas, magnésicas o de trietilamina (TEA).

Principalmente, se utiliza como detergente en productos de limpieza (> 80%²³), en formulaciones donde la cadena alquílica posee un número de carbonos de entre 10 y 13. 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. Además, El LAS se encuentra en la formulación de detergentes del sector industrial e

³⁹ Penteadó J., Seoud O., Carvalho L. *Linear Alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis*. Quím. Nova 29; 1038-1046, 2006.

⁴⁰ Berna J. *European Environmental Safety Legislation. Handbook of detergents*. Marcel D Dekker Inc. New York, USA, p. 318, 2003.

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 en la flotación de minerales. Es utilizado, asimismo, como agente emulsionante en las reacciones de polimerización en el sector petroquímico. Alquilbencenos con más de 14 carbonos son poco solubles en agua, debido a su hidrofobicidad, aunque sí son solubles en disolventes orgánicos. Disoluciones en aceite mineral son usadas como lubricantes en procesos industriales de corte y taladrado de metales. En la **Figura 1.23**, se representa la distribución de las distintas aplicaciones del LAS²³, en los detergentes.

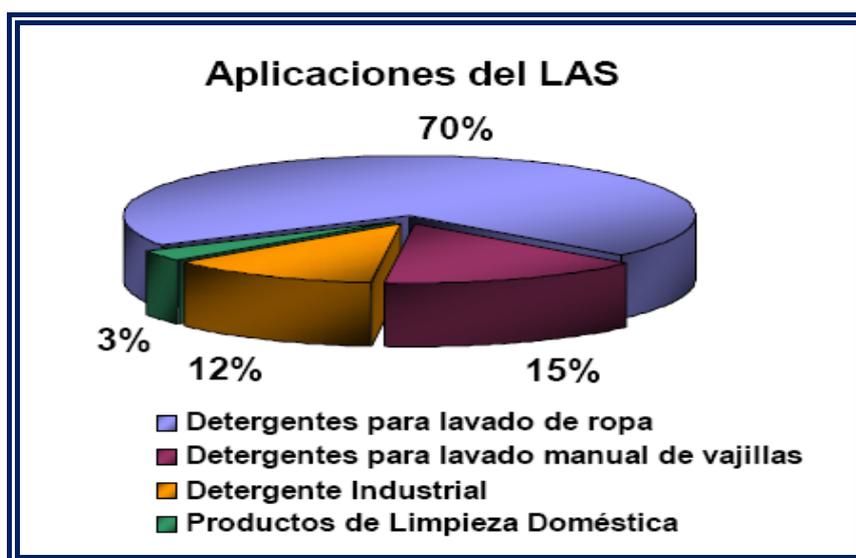


Figura 1.23- Aplicaciones del tensioactivo LAS en detergentes.

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 ventajas⁴¹, se puede citar:

- Excelentes propiedades como tensioactivo.
- Buen comportamiento ambiental, pues su biodegradabilidad tanto primaria como final son elevadas, es decir, tanto el *LAS* como sus metabolitos presentan una alta biodegradabilidad y muy baja toxicidad.
- Compatibilidad con todo tipo de fórmulas e ingredientes. Puede ser usado en la formulación de polvos concentrados y líquidos para lavado de ropa, lavavajillas.
- Versatilidad de uso en todo tipo de fórmulas.
- Sinergismo con otros ingredientes habituales de las formulaciones.
- Muy baja relación coste/rendimiento.

⁴¹ Berna J y colaboradores. *LAB sulfonation*. Petresa. Avda. del Partenón, 12-15th, floor. 28042. Madrid, 2001.

- 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.
- Estabilidad del producto sulfonado y neutralizado sin alteración del pH con el tiempo (no hidrolizable).
- Fácilmente transportable, manipulable y almacenable, ya que su forma ácida (*HLAS*) es químicamente estable, lo que no ocurre con otros tensioactivos.
- Compatibilidad con agentes tensioactivos para constitución de sistemas activos mixtos.

2.3.2 - Consumo y aplicaciones del jabón

El jabón es el tensioactivo aniónico más consumido. En 2005, su producción se estima en torno a 10.000 kton en 2005⁴². En cuanto al consumo en Europa occidental, fue calculado un consumo 700 kton³², teniendo en cuenta que la producción total de tensioactivos es de 2.800 kton³².

⁴² COMITE EUROPEEN DES AGENTS DE SURFACE ET DE LEURS INTERMEDIAIRES ORGANIQUES (CESIO) *Cesio surfactants statistics 2005*.

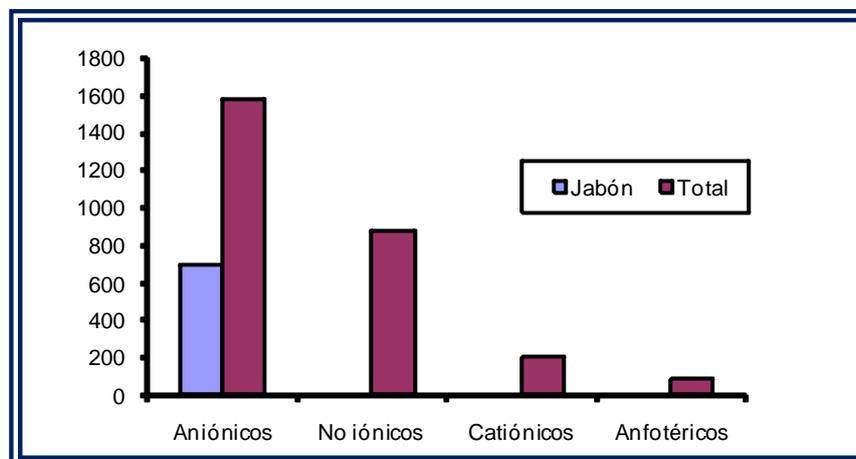


Figura 1.24- Consumo de tensioactivos en Europa Occidental en Kiloneladas.

En cuanto a sus aplicaciones, aunque el jabón es, por lo general, conocido como agente de limpieza y la mayor parte del jabón que se produce se utiliza para éste fin, tiene otros importantes usos como emulsivo²:

➤ *Limpieza y Lavandería.* Un elevado porcentaje del jabón sintetizado se destina a aseo y al lavado tanto doméstico como industrial.

➤ *Textiles.* En la industria textil se emplea el jabón en las operaciones de lavado, remojo, enfurtido, impermeabilización, abrillantado y apresto.

➤ *Alimentos.* En la elaboración de alimentos, es imprescindible el cumplimiento de las normas de higiene. El jabón se emplea para tener a los operarios y sus ropas en buen estado de limpieza, para limpiar el equipo, los locales en que se almacenan los alimentos, y en muchos casos, para limpiar la superficie exterior de los productos sometidos a elaboración. El jabón se usa para lavar las frutas y legumbres, con objeto

de eliminar los posibles restos de insecticidas, la suciedad y materias extrañas de origen orgánico.

➤ *Jabones Sanitarios.* Los jabones potásicos son utilizados en la limpieza de hoteles, fábricas, restaurantes, tiendas y edificios de oficinas. Se utilizan también jabones líquidos para las manos en los cuartos de aseo, se obtienen a partir de aceite de coco. Los jabones para el fregado de los suelos se fabrican con aceites de maíz o de soja.

➤ *Jabones Medicinales.* Se fabrican muchos jabones con ingredientes medicinales para destruir bacterias y hongos, o para producir efectos especiales en la piel. Tales ingredientes son: fenoles, ácidos cresílicos, compuestos de mercurio, azufre, G 11 [bis(2 hidroxí 3,5,6 tri-cloro- fenilo)] y clorofila. Algunos jabones medicinales son usados por los cirujanos en la preparación de operaciones quirúrgicas.

➤ *Caucho Sintético.* Se utiliza para emulsionar los ingredientes en agua. Se polimeriza la emulsión hasta formar un látex líquido artificial, que se coagula, y se somete a proceso para la transformación en caucho.

➤ *Pinturas.* El jabón es un importante ingrediente en las pinturas, ya que se emplean con cierta extensión en la elaboración de pigmentos.

➤ *Plásticos.* Se ha tenido buen éxito en la polimerización de emulsiones gracias al empleo del jabón. El producto es una dispersión en agua.

➤ *Papel.* Se utiliza como detergente, emulsivo y lubricante. Su función más importante es la emulsiva, y se utiliza en la fabricación de aprestos, acabados y revestimientos

➤ *Producción de petróleo.* El jabón se usa en lodos de perforación para aumentar la producción de petróleo de los pozos, debido a su propiedad de formar espuma, también se utiliza en la recuperación de petróleo residual de los pozos, y en la recuperación del petróleo del cieno.

➤ *Agricultura.* Se utiliza en la fabricación de insecticidas y para evitar las infecciones en el ganado.

➤ *Cosméticos.* En la manufactura de los cosméticos, el jabón es, por su poder emulsivo, ingrediente importante en casi todas las fórmulas. La mayor parte de los jabones empleados se forman “in situ” durante la mezcla de la fase acuosa y la oleosa.

2.4 - Comportamiento ambiental del jabón y del LAS

2.4.1 - Biodegradabilidad del LAS

El origen del LAS radica en requisitos de tipo ambiental, ya que su síntesis nace de la necesidad de encontrar un sustitutivo al sulfonato de alquibenceno ramificado (BABS). El BABS es una sustancia que presenta en su estructura una zona lipofílica formada por cadenas ramificadas, que impide que los microorganismos encargados de degradar la materia orgánica pudieran actuar sobre él. Esto provoca la existencia de problemas de acumulación de espumas que, además, del impacto visual que genera, impedía 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 principios de la década de los 60, en el río Necker (Alemania), con concentraciones del orden de $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tensioactivos aniónicos.

Otro problema añadido es la acumulación de espumas en las plantas depuradoras, que provoca la muerte de los microorganismos que actúa en los lodos activados, bajo condiciones aerobias, y de este modo, disminuyese considerablemente la eficiencia de degradación de dichas plantas.

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 alquílica lineal es fácilmente accesible a este tipo de microorganismos, y por tanto, es fácilmente biodegradable.



Figura 1.25- Formación de espuma antes de la síntesis del LAS y después.

- Biodegradación aeróbica en medio acuoso

La primera descripción detallada de la degradación aeróbica del *LAS* fue realizada por *Swisher*¹⁸ y *Schöberl*⁴³. 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 (ω -oxidación), originando los sulfofenil carboxilatos (*SPCs*, del inglés *Sulfo Phenyl Carboxylic Acids*) como intermediarios de biodegradación (degradación primaria). Estos compuestos intermedios poseen una toxicidad mucho menor que la molécula madre⁴⁴, 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^{45,46}.

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 Swisher¹⁸”, de forma que, de un modo general, se puede decir que la velocidad de degradación aumenta cuando

⁴³ Schöberl P. *Basic principles of LAS biodegradation*. *Tenside Surf. Det* 26; 86-94, 1989.

⁴⁴ Kimberle R.A. *Aquatic and terrestrial ecotoxicology of LAS*. *Tenside Surf. Det.* 26; 169-176, 1989.

⁴⁵ 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.

⁴⁶ Swisher R.D. *Biodegradations of ABS in relation to chemical structure*. *J. Water Poll. Control Fed.* 35;1557-1564, 1963.

se incrementa la distancia del grupo metilo terminal al lugar donde se acopla el grupo sulfofenilo, o cuando se incrementa la longitud de la cadena alquílica (por ejemplo, el isómero 2ØC12-LAS se degrada más rápidamente que el 6ØC12-LAS, y éste a su vez más rápidamente que el 6ØC11-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 -oxidación⁴⁷, 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 de esta ruptura es la formación del 4-sulfocatecol⁴⁸, ya que muchos microorganismos que degradan el LAS presentan altos niveles de la enzima 4-sulfocatecol 1,2 dioxigenasa⁴⁹.

Aunque la β -oxidación es la principal vía de destrucción de la cadena alquílica del LAS, también puede ocurrir la eliminación de carbonos a través de la α -oxidación, pero esta posibilidad ocurre en menor grado. Esta ruta alternativa fue postulada para intentar explicar el hallazgo del

⁴⁷ Huddleston R.L., Allred R.C. *Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes*. Dev. Ind. Microbiol. 4; 24-38, 1963.

⁴⁸ 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.

⁴⁹ 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.

C5-SPC como producto de degradación del C12-LAS⁵⁰ 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 C11-LAS⁵¹.

La biodegradación completa del LAS concluye con la desulfonación de la molécula con total mineralización del compuesto en CO₂, H₂O, Na₂SO₄, y la incorporación de estas sustancias a la biomasa del ecosistema^{52,53} (degradación última).

Una de las primeras evidencias que demostró que el LAS se biodegradaba para dar CO₂ fue una simulación llevada a cabo en el laboratorio, la cual consistió en dopar el anillo aromático del LAS con ¹⁴C como radioisótopo⁵⁴. El seguimiento ambiental del carbono isotópico permitió demostrar la total degradación del LAS.

La biodegradación primaria del LAS, medida por MBAS (del inglés **M**ethylene **B**lue **A**ctive **S**ubstance) o por métodos analíticos específicos como HPLC (del inglés **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatographic), en

⁵⁰ 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.

⁵¹ 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.

⁵² Heinze J.E., Britton L.N. *Anaerobic Degradation: Environmental Relevance. 3° World Conference on Detergent*. A. Cahn, AOCS, Champaign, USA, pp. 235-239, 1994.

⁵³ Karsaand D.M., Porter M.R. *Biodegradability of surfactants*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK, 1995.

⁵⁴ Nielsen A.M., Huddleston R.L. *Ultimate biodegradation of LAS and ring carbon*. Developments in Industrial Microbiology. V.22, Society for Industrial Microbiology, 1981.

cualquiera de los métodos OECD , es mayor del 80%⁵⁵. Del mismo modo, la degradación última del LAS, medida por COD, (carbono orgánico disuelto) está comprendida, usando lodos activados, en un intervalo de 80-95 % para el test OECD 3003 A, y en un intervalo de 95-98 % para el test OECD 302.

Para el test *OECD 3003 A*, se hicieron estudios de la influencia de la temperatura en la biodegradación (entre 9-25 °C)⁵⁶, comprobándose que el tiempo de aclimatación de los microorganismos varía en función de la temperatura, siendo más alto a temperaturas más bajas; sin embargo, el porcentaje de biodegradación se mantuvo (> 95%) para todas las temperaturas ensayadas^{57,58}.

Considerando la baja toxicidad y la poca persistencia en el medio de los intermedios de degradación del LAS, los SPCs⁵⁹; desde un punto de vista meramente ambiental, tiene más sentido el estudio de los parámetros de la biodegradación primaria, dando una importancia más relativa a resultados obtenidos por la degradación última. Teniendo en cuenta esta premisa, se llevaron a cabo varios estudios para la determinación de la cinética de degradación del LAS, y el posterior cálculo de la vida media($t_{0.5}$) de su degradación primaria. En dichos estudios, se aplicaron innovadoras

⁵⁵ EU commission. *Study on the possible problems for the aquatic environment related to surfactants in detergents*. WRc. EC 4294. February, 1997.

⁵⁶ Prats D. y colaboradores. *The effect of the temperature in the aerobic biodegradation of anionic and nonionic surfactants*. 10th Giornate CID, Milano, 2003.

⁵⁷ Prats D., López C., Vallejo D., Varó P., León V.M. *Effect of the temperature on the biodegradation of LAS and alcohol ethoxylates*. Journal of Surfactants and Detergents. (9)1; 69-75, 2006.

⁵⁸ 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 activate sludge treatment*. Chemosphere. 64; 1157-1166, 2006.

⁵⁹ Kimberle R.A., Swisher R.D. *Reduction of aquatic toxicity of LAS by biodegradation*. Water Res. 11;31, 1977.

técnicas como, por ejemplo, el estudio de la evolución de radioisótopos ($^{14}\text{CO}_2$) mediante LSC (del inglés **L**iquid **S**cientillation **C**ounting), y siguiendo la biodegradación por una Radio Cromatografía en Capa Fina⁶⁰. En estos estudios, usando agua como medio, se obtuvieron un tiempo de vida medio para la biodegradación primaria de 12 horas ($t_{0.5}=12\text{h}$)⁶¹. Estos resultados son entre 10-15 veces menor al observado en test donde el medio utilizado es lodo activado.

Los estudios de campo, llevados a cabo en algunos ríos bajo condiciones ambientales reales, mostraron un $t_{0.5}$ de entre 1-3 horas, indicando que las cinéticas de degradación eran más rápidas que aquéllas desarrolladas en el laboratorio^{62,63}. Esta disparidad de resultados se debe a las condiciones más favorables del medio, las cuales son muy difíciles de reproducir en el laboratorio.

Por tanto, y en resumen, para los posteriores estudios de evaluación de riesgos ambiental²³, se tomaron como valores verdaderos aquéllos obtenidos bajo condiciones ambientales reales.

⁶⁰ Federle T.W., Schwab B.S. Comprehensive approach for assessing the kinetics of primary and ultimate biodegradation of chemicals in activated sludge: application on LAS. *Environ. Sci. Technol.* 31; 1178-1184, 1997.

⁶¹ Itrich N.R., Federle T.W. Primary and ultimate biodegradation of anionic surfactants under realistic discharge conditions in river water. *SETAC Meeting*. Vancouver, Canada, 1995.

⁶² Schröder F.R. Concentrations of anionic surfactants in receiving river-Pine water, *Tenside Surf. Det.* 32; 492-497, 1995.

⁶³ Fox K.K., Holt M.S., Daniel M., Buckland H., Guymer I. Removal of LAS from a small Yorkshire stream. Contribution to GREAT-ER project, *Sci. Total. Environ.* 251/252; 265-275, 2000.

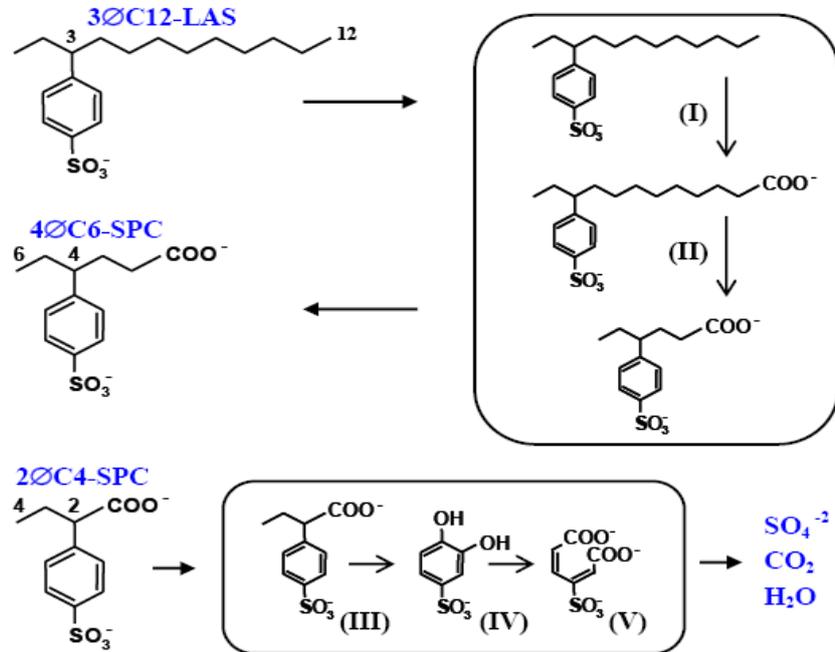


Figura 1.26- Proceso de biodegradación aeróbica del LAS, donde se puede observar una posible ruta de degradación. Para que esto ocurra es necesario distintas etapas y/o reacciones como: (I) ω -oxidación; (II) β -oxidación; (III) remoción de la cadena alquílica con dioxigenación formando el 4-sulfocatecol; (IV) apertura del anillo bencénico; (V) desulfonación.

- Biodegradación bajo condiciones anaeróbicas

Se realizaron test de biodegradación anaerobia^{64,65}, en los cuales se midió la degradación última mediante la determinación de gas generado (CH_4) después de dos meses de incubación. Los resultados mostraron que el LAS

⁶⁴ ECETOC. Special report No. 28. *Evaluation of anaerobic biodegradation*. ECETOC. Brussels, 1994.

⁶⁵ ERASM. *Anaerobic biodegradation. Review of scientific information*, AISE/CESIO, Brussels, 2007.

no sufría degradación significativa bajo las condiciones del ensayo^{66,67}. Sin embargo, en condiciones de oxígeno limitadas, como ocurre en el mundo real, la biodegradación del LAS puede iniciarse y, después, continuar bajo condiciones anaerobias⁶⁸. De hecho, una poca cantidad de inoculo es capaz de metabolizar el LAS bajo condiciones anaeróbicas particulares, por ejemplo, aquéllas en las que el LAS es la única fuente de azufre⁶⁹. En cualquier caso, la biodegradación bajo estrictas condiciones anaeróbicas tiene, de manera directa, poca relevancia ecológica⁷⁰.

Del mismo modo, se llevaron a cabo estudios⁷¹, que demostraron que a pesar de las altas concentraciones de LAS (30 g·Kg⁻¹) encontradas en ciertos compartimentos ambientales anaeróbicos (lodos de digestores anaeróbicos de una depuradora de agua residual), no existía ningún riesgo para la población bacteriana alojada dentro del digestor.

- Biodegradación en suelo

Existen en la literatura varias referencias de medidas, tanto en el laboratorio como estudios de campo, de suelos enmendados con

⁶⁶ Gejlsbjerg B., Andersen T.T., Madsen T. *Mineralization of organic contaminants under aerobic and anaerobic conditions in sludge-soil mixtures*. J. Soils and Sediments 4;30-36, 2004.

⁶⁷ García M.T., Campos E., Ribosa I., Latorre A., Sánchez-Leal. *Anaerobic digestion of LAS: biodegradation kinetics and metabolite analysis*. Chemosphere 60; 1636- 1643, 2003.

⁶⁸ León V.M., González-Mazo E., Forja Pajares J.M. *Vertical distribution profiles of LAS and their long-chain intermediate degradation products in coastal marine sediments*. Environ. Tox. Chem. 20; 2171- 2178, 2001.

⁶⁹ Denger K., Cook A.M. *LAS bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulphur*. J. Appl. Microbiol. 86; 165-168, 1999.

⁷⁰ SCHER (Scientific committee on Health and Environmental Risk). *Opinion on "Environmental risk assessment of non biodegradable detergent surfactants under anaerobic condition"*. European Commission, Directorate C7, 25/11/05, 2005.

⁷¹ Berna J.L., Ferrer J., Moreno A., Prats D., Ruíz Bevia F. *The fate of LAS in the environment*. Tenside Surf. Det. 26;101-107, 1989.

lodos^{72,73,74}. Estas investigaciones consistieron en aplicar una cantidad de lodos de EDAR, con contenido en LAS, a parcelas agrícolas. En todos estos estudios, los tiempos de vida medio calculados, para la degradación última y en estudios de campo, estaban comprendidos entre 3-33 días.

En cuanto a los ensayos de laboratorio, los cuales fueron obtenidos mediante el seguimiento con ¹⁴C de mezclas de lodo y sólido dopado con LAS, los resultaron arrojaron tiempos de vida media, para degradación última, de entre 2.6 y 26 días^{75,76,77}.

Sin embargo, por los motivos expuestos anteriormente, el estudio del tiempo de vida medio para la biodegradación primaria tiene mayor relevancia ambiental que el medido para la biodegradación última. Estos estudios, los que miden el tiempo de vida media de la degradación primaria, dieron como resultados, en estudios de laboratorio, $t_{0.5}$ de entre 1-3 días⁷⁸. En cuanto a los ensayos de campo, estos dieron resultados de tiempos de vida media de entre 3 y 7 días⁷⁹.

⁷² Cavalli L., Valtorta L. *Surfactants in sludge-amended soil*. Tenside Surf. Det. 36; 22-28, 1999.

⁷³ De Wolf W., Feijtel T.C.J. *Terrestrial risk assessment for LAS in sludge amended-soils*. Chemosphere. 36; 1319-1343, 1998.

⁷⁴ Jensen J. *Fate and effects of LAS in the terrestrial environment*. Sci. Tot. Environ. 226; 93-111, 1999.

⁷⁵ Figge K., Schöberl P. *LAS and the application of sewage sludge in agriculture*. Tenside Surf. Det. 26; 122-128, 1989.

⁷⁶ Gejlsjerg B., Klinge C., Madsen T. *Mineralization of organic contaminants in sludge-soil mixtures*. Environ. Toxic. Chem. 20; 698-705, 2001.

⁷⁷ Gejlsjerg B., Madsen T., Andersen T.T. *Comparison of biodegradation of surfactants in soils and sludge-amended mixtures by use of ¹⁴C-labelled compounds and automated respirometry*. Chemosphere 50; 321-331, 2003.

⁷⁸ Elsgaard L., Pojana G., Miraval T., Eriksen J., Marcomini A. *Biodegradation of LAS in sulfate-leached soils mesocosms*. Chemosphere 50; 929-937, 2003.

⁷⁹ Kückler T., Schaank W. *Behaviour of LAS in sandy soils with low amounts of organic matter*. Chemosphere 35; 153-167, 1997.

- Degradación de hidrólisis y fotólisis

El *LAS* sufre tanto reacciones de hidrólisis⁸⁰ como de fotólisis⁸¹, sin embargo, ambos fenómenos tienen poca relevancia ambiental.

En la **Tabla 1.10**, se resumen las principales propiedades de degradación del *LAS*.

⁸⁰ Cross J. *Anionic surfactants: Chemical analysis*. M Dekker (ed). V.8. 111-115, 1977.

⁸¹ Venhuls S.A., Mehrvar M. *Photolytic treatment of aqueous LAS*. J. Environ. Sci. Health. 40; 1731-1739, 2005.

Tabla 1.10- Propiedades de degradación del LAS.

LAS	PROTOCOLO	RESULTADOS
"Screening"	OECD 301 D OECD 303 A	> 99% (degradación primaria)
Test de prueba	OECD 301 A, B, D, E, F ISO 1493/1999	> 70% (COD) > 60% (evolución CO ₂)
Test inherente	OECD 302 A, B	95-98% (COD)
Test de simulación	OECD 303 A	80-95% (COD)
Rango de biodegradación en lodos activados		t _{0,5} =0.6-0.7 h (bio. pri.) t _{0,5} =1.3-1.4 h (bio. ult.)
Rango de biodegradación en agua de río	Monitorización de ríos	t _{0,5} =12 h (bio. pri.) t _{0,5} =18 h (bio. ult.) t _{0,5} =1-3 h (bio. pri.)
Biodegradación anaeróbica	ECETOC Estudio de investigación	0% (Bio. ult.) 5-44% (bio. pri.)
Rango de biodegradación en suelo	Estudio de campo Estudio de laboratorio	t _{0,5} =1-7 días (bio. pri.) t _{0,5} =2-26 días (bio. ult.)
Hidrólisis	Estudio de investigación	Descomposición: 60-70% en presencia de ácidos inorgánicos a 150- 200°C
Fotólisis	Estudio de investigación	Degradación: 80-95% bajo lámpara de mercurio (200 nm-450 nm)

2.4.2 - Eliminación del LAS

- Sistema de alcantarillado

El LAS se degrada en torno al 68%^{82,83} en los sistemas de alcantarillado, eso es debido a la combinación de una serie de fenómenos; adsorción, precipitación, y biodegradación. Los ensayos realizados en campo demostraron que los tensioactivos se degradan en mayor o menor proporción, dependiendo de la longitud del sistema de alcantarillado, del tiempo de residencia y de la población bacteriana⁸⁴.

- Estaciones EDAR.

Existe un gran número de referencias^{85,86}, que prueban que la eliminación del LAS, en presencia de lodos activados de EDAR, está comprendido entre el 98% y el 99.9%. Un hecho importante que hizo aumentar la eficacia de la eliminación fue cuando se instalaron los reactores de membrana biológica en las plantas depuradoras, los cuales, hasta entonces, eran inviables, debido a su alto coste⁸⁷.

⁸² Moreno A., Ferrer J., Berna J.L. *Biodegradability of LAS in a sewer system*. Tenside Surf. Det. 27; 312-315, 1990.

⁸³ Matthijs E., Holt M.S., Kiewiet A., Rijs G.B. *Environmental monitoring for LAS, AE, AES, AS and soap*. Environ. Toxicol. Chem. 18; 2634-2644, 1999.

⁸⁴ Matthijs E., Debaere G., Itrich N., Masscheleyn P., Rottiers A., Stalmans M. *The fate of detergents surfactants in sewer systems*. Wat. Sci. Tech. 31; 321-328, 1995.

⁸⁵ Painter H.A., Zabet T. *Review of the environmental safety of LAS*. WRc Report, UK, 1989.

⁸⁶ Waters J., Feijtel T.C.J. *AISE/CESIO environmental surfactant monitoring programme: outcome of five national pilot studies on LAS*. Chemosphere 30; 1939-1956, 1995

⁸⁷ Terzic S., Matosic M., Ahel M., Mijatovic I. *Elimination of aromatic surfactants from municipal wastewaters: comparison of conventional activated sludge treatment and membrane biological reactor*. Water Science and Technology 51; 447-453, 2005.

Haciendo un balance de masas, podemos constatar que el LAS se degrada en un intervalo comprendido entre el 73 y el 83%; un porcentaje (15-20%), se queda absorbido en el lodo, y tan solo un 2% es liberado al agua⁸⁷ (*Figura 1.27*).

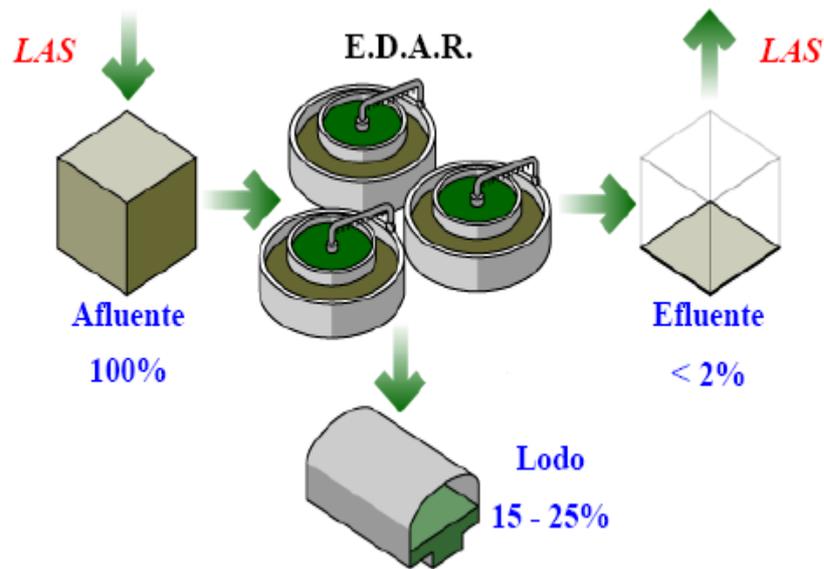


Figura 1.27- Eficiencia del proceso de eliminación del LAS en una planta depuradora.

2.4.3 - Estudios de monitorización

- Agua superficial

Se han llevado a cabo estudios de monitorización en agua residuales en diferentes países de la Unión Europea (Alemania, España, Italia, Holanda y Reino Unido). En los mismos usando el mismo protocolo y basándose

en estudios previos⁸⁸, se obtuvieron un amplio rango de resultados, que ha permitido establecer un mapa actual del contenido de *LAS* en los efluentes de depuradoras, así como su posterior comportamiento cuando son aportados a las cuencas fluviales de los ríos^{89,90,91,92}.

De este modo, nos podemos encontrar concentraciones de *LAS* entre 1-15 mg·L⁻¹^{77,84} en la entrada de las depuradoras, y de 8 a 200 µg·L⁻¹, en la salida de las mismas depuradoras, con una media aritmética sobre 46 datos de 42.8 µg·L⁻¹^{77,84}. Si tenemos en cuenta el tiempo de vida media calculado de 3 h, la concentración media de *LAS* disminuiría a < 2µg·L⁻¹ en un sólo día.

La proporción de cada uno de los homólogos del *LAS* encontrado, difiere bastante con el comercial, ya que su composición varía de manera significativa, C₁₀C₁₁C₁₂C₁₃=45:30:23:2, con una media de carbono de 10.8 frente al 11.6 comercial. Esto es debido a dos procesos: a) la biodegradación en agua es mayor para los homólogos de mayor cadena y, b) , la adsorción en sedimentos y en sólidos en suspensión es menor para homólogos de cadena corta^{82,83,93,94}.

⁸⁸ Cavalli L., Gellera A., Landone A. *LAS removal and biodegradation in wastewater treatment plant*. Environ. Toxic. Chem. 12; 1777-1788, 1993.

⁸⁹ Di Corcia A., Samperi R., Belloni A., Marcomini A., Zanette M., Lemr K., Cavalli L. Riv it. Sostanze Grasse LXXI: 467-475, 1994.

⁹⁰ Feijtel T.C.J., Matthijs E., Rottiers A., Rijs G.B.J., Kiewiet A., de Nijs A. *AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. Part 1: LAS monitoring study in "de Meer" STP and receiving river "Leidsche Rijn"*. Chemosphere 30; 1053-1066, 1995.

⁹¹ Holt M.S., Water J., Comber M.H.I., Armitage M., Morris G., Newbery C. *AIS/CESIO environmental surfactant monitoring programme. SDIA sewage treatment pilot study on LAS*. Wat. Res. 29; 2063-2070, 1995.

⁹² Sánchez-Leal J., García M.T., Tomás R., Ferrer J., Bengoechea C. *Tenside Surf. Det.* 31; 253-256, 1994.

⁹³ Prats D., Vazquez B., Zarzo D., Berna J.L., Moreno A. *LAS homologue distribution shift during waste water treatment and composing*. Environ. Tox. Chem. 12; 1599-1608, 1993.

De la misma forma, en otro estudio de impacto ambiental realizado en el marco del proyecto GREAT-ER (del inglés **Geography-Referenced Exposure Assessment Toll for European Rivers**), se monitorizaron, durante dos años, varias depuradoras del Reino Unido y varios ríos, analizándose miles de muestras. Los resultados dieron medidas de LAS en los efluentes de depuradora de entre 7 y 273 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Merece la pena destacar que para aquellas depuradoras con tratamiento terciario adicional, se encontraron concentraciones por debajo de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Finalmente, cabe resaltar el estudio realizado por *Temminck* y colaboradores⁹⁵, en el cual se monitorizó el comportamiento del homólogo C₁₂ en una planta depurada a través del diseño de una planta piloto a escala. Para la obtención de resultados con relevancia ambiental, se establecieron condiciones semejantes a las ambientales. El resultado del estudio arrojó que el porcentaje de biodegradación era mayor del 99%.

- Agua subterránea

Actualmente, no existen estudios de monitorización específicos para aguas subterráneas en la Unión Europea. Sin embargo, en Estados Unidos, se estudió el comportamiento del LAS en aguas subterráneas⁹⁶. En todas muestras analizadas, los contenidos fueron inferiores al límite de detección. En un estudio posterior, también en Estados Unidos, utilizando

⁹⁴ Tabor C.F., Barber L.B. *Fate of LAS in the Mississippi river*. Environ. Sci. Technol. 30; 161-171, 1996.

⁹⁵ Temminck H., Klapwijk B. *Fate of LAS in activated sludge plants*. Water Res. 38; 903-912, 2000.

⁹⁶ Larson R.J., Federle T.W., Shimp R.J., Venturello R.M. *Behaviour of LAS in soil infiltration and groundwaters*. Tenside Surf. Det. 26; 116-121, 1989.

técnicas analíticas más sensibles⁹⁷, y después de aplicar cantidades elevadas de LAS en la superficie, se pudieron detectar cantidades de LAS de hasta 3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

- Lodos de EDAR

Existen numerosos artículos que hacen referencia al análisis del LAS en lodos EDAR^{98,99,100,101}. La concentración media encontrada para lodos aeróbicos en estos estudios, está siempre por debajo de 0.5 $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de lodo. Sin embargo, para lodos anaerobios, se llegaron a detectar concentraciones mucho mayores, de $> 1\text{gr}\cdot\text{Kg}^{-1}$ hasta 30 $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Estas altas concentraciones son debidas a la tendencias que tiene todo tensioactivo aniónico, y en concreto el LAS, a precipitar en presencia de aguas duras.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos desde 1988 hasta 2006 (155 datos), se calculó, a nivel de la Unión Europea, una media de 5.56 $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de LAS en lodos anaerobios, donde el valor más alto fue el encontrado en España⁶⁵ (30 $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

⁹⁷ Field J.A., Barber L.B., Thurman E.M., Moore L.B., Lawrence D.L., Peage D.A. *Fate of alkylbenzene sulphonates and diakyltetralin sulphonates in sewage-contaminated groundwaters*. Environ. Sci. Technol. 26; 1140-1146, 1992.

⁹⁸ Fraunhofer. *Anaerobic degradation of detergent surfactans. Final report for the European Commission*. 308pp. Fraunhofer-Institute für Umwelt, Oberhausen, Germany, 2003.

⁹⁹ Jensen J., Jepsen S.E. *The production, use and quality of sewage in Denmark*. Waste management. 25; 239-247, 2005.

¹⁰⁰ Leschber R. *Evaluation of micro-pollutans in sewage sludge. Provisional report*. Eds: BM Gawlik, Bidoglio G. European Commission DG JRC Ispra, 2004.

¹⁰¹ Schowanek D., David H., Francaviglia R., Hall J., Kirchmann H., Krogh P.H., Smith S., Schraepen N. *Probabilistic risk assessment for LAS in sewage sludge used on agriculture soil*. 2001.

Al igual que ocurre en agua, la proporción de cada uno de los homólogos del LAS difiere con respecto al comercial, ya que, como se mencionó con anterioridad, los homólogos de mayor cadena tienen mayor tendencia a adsorberse que los de menor longitud, dando lugar a una composición de: $C_{10}C_{11}C_{12}C_{13} = 7:24:39:30$ con una media de 11.9.

Para terminar, cabe resaltar que existen notables diferencias de concentración de LAS entre un lodo de EDAR húmedo y ese mismo lodo seco, después de varios meses, el cual va a ser aplicado en suelos agrícolas, ya que en el proceso de secado se puede llegar a perder más de 74% de la concentración de LAS que había en el lodo húmedo inicial¹⁰². Del mismo modo, un adecuado proceso de compostaje del lodo EDAR puede reducir la concentración del LAS en más de un 98% con una vida media de 7-9 días^{103,104,105}.

- Suelos

La concentración de LAS en suelos enmendados con lodo, por media, ronda los 5 mg·Kg⁻¹. No obstante, la concentración depende, sobre todo, de cuándo se toma la muestra con respecto al tiempo de aplicación del

¹⁰² Carlsen L., Metzon M.B., Kjelsmark J. *LAS in the terrestrial environment*. Sci. Total. Environ. 290; 225-230, 2002.

¹⁰³ Petersen P.H. *Degradations fo xenobiotic by composting*. Ramboll 1999, presented in the SPT/EPA-1999 workshop. Denmark, 1999.

¹⁰⁴ Prats D., Rodríguez M., Muela M.A., Llamas J.M., Ferrer J., Moreno A., Berna J.L., Nielsen A.M., Naylor C. *Elimination of LAS in sewage biosolids by composting*. 5th World Cesio Congress. V.2: 1655-1658. Firenze, Italy, 2000.

¹⁰⁵ Sanz E., Prats D., Rodríguez M., Camacho A. *Effect of temperature and organic nutrients on the biodegradation of LAS during the composting of anaerobically sludge form a wastewater treatment plant*. Waste Management 26; 1237-1245, 2006.

lodo. Así, si tomamos la muestra 30 días después de la aplicación del lodo es probable encontrarse con valores de *LAS* por debajo de $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.¹⁰⁶

Un estudio más reciente realizado en la Universidad de Granada⁹, consistente en la aplicación estacional de *LAS* a un parcela agrícola, y posterior medida a diferentes profundidades, demostró que el tiempo de vida media para una cantidad de muestra de $1 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ de *LAS* no excedía en ningún caso los 12 días.

- Sedimentos

Los valores encontrados para el *LAS* junto a los emisarios marinos se encuentran comprendidos entre 0.5 y $5.3 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (con una media aritmética de $2.9 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ -12puntos-).¹⁰⁷

Debido a las mismas razones anteriormente expuestas, La distribución de homólogos es parecida a la obtenida en el caso de los lodos de EDAR.

En la **Tabla 1.11**, se resumen el rango de concentraciones típico de *LAS* para diferentes matrices ambientales.

¹⁰⁶ Solbé J., Berna J.L., Cavalli L., Feijtel T.C.J., Fox K.K., Heinze J., Marshall S.J., De Wolf W. *Terrestrial risk assessment of LAS in sludge-amended soils*. 5thWorld Cesio Congress V.2.; 1433- 1438. May-June. Firenze. Italy, 2000.

¹⁰⁷ Cavalli L., Cassani G., Vigano L., Pravettoni S., Nucci G., Lazzarin M., Zatta A. *Surfactants in sediments*. Tenside Surf. Det. 36; 254-258, 2000.

Tabla 1.11- Concentración del LAS en diferentes compartimentos ambientales.

COMPARTIMENTO AMBIENTAL	CONCENTRACIÓN DE LAS TOTAL
Entrada EDAR	1-15 mg·L ⁻¹
Salida EDAR	8 – 200 µg·L ⁻¹
Agua de río ¹⁰⁸	< 2- 47 µg·L ⁻¹
Aguas subterráneas	0 – 3 µg·L ⁻¹
Lodos de EDAR secos	< 1g·Kg ⁻¹ - 30 g·Kg ⁻¹
Suelos	5 mg·Kg ⁻¹
Sedimentos de río	0.5 - 5.3 mg·Kg ⁻¹

2.4.4 - Actividad ambiental del LAS

La presencia de los tensioactivos en el medio puede incidir de manera negativa sobre los individuos que habitan en él. Por tanto, un aspecto esencial a estudiar es el de su posible 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 otros²³.

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*); esta relación *PEC/PNEC* debe ser siempre menor que la unidad

¹⁰⁸ 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.

para que el riesgo ambiental sea bajo. En el caso del LAS se han estudiado diferentes ecosistemas²³ obteniendo en todos una relación menor que la unidad, lo que indica su bajo índice de toxicidad ambiental.

Tabla 1.12- Relación PEC/PNEC del LAS en diferentes medios ambientales.

LAS	PEC	PNEC	PEC/PNEC
Agua, mg·L ⁻¹	0.047	0.27	0.17
Suelo, mg·Kg ⁻¹	1.4	35	0.04
Lodo de EDAR, g·Kg ⁻¹	5.56	49	0.11
Efluente de EDAR, mg·L ⁻¹	0.27	3.5	0.08
Sedimentos, mg·Kg ⁻¹	5.3	8.1	0.65

Se han descrito diversos efectos que los tensioactivos pueden causar sobre las membranas celulares y proteínas, debido a la actividad superficial que presentan¹⁰⁹. Como consecuencia de estos efectos, pueden ser inhibidores de bacterias¹¹⁰, hongos y otros habitantes del ecosistema del suelo. Por esta razón, la exposición del suelo^{111,112} de cultivo a estos compuestos puede alterar su actividad biológica, acción que es muy importante para la calidad del suelo y del ciclo nutricional¹¹³, además, pueden inhibir

¹⁰⁹ 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.

¹¹⁰ Hartmann L. *Effect of surfactants on soil bacteria*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1: 219-224, 1996.

¹¹¹ 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.

¹¹² Wilke B., *Effects of non-pesticide organic pollutants on soil microbial activity*. *Adv. GeoEcol.* 30; 117-132, 1996.

¹¹³ 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.

notablemente bacterias reductoras de hierro y afectar tanto a bacterias Gram-negativo como Gram-positivo¹¹⁴.

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 alquímica lineal, aumenta la toxicidad del compuesto¹¹⁵.

2.4.5 - El LAS y la 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 los datos de contaminación, y considerar que la sustancia no provoca efectos adversos hacia el organismo. El *NOAEL* se estimó para el caso del LAS en $85 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal²³ considerando que, de los numerosos estudios realizados, es el valor que

¹¹⁴ Elsgaard L., Petersen S.O., Debosz K., Kristiansen I.B. *Effects of LAS on soil microbiology*. Tenside Surf. Det., 38; 2, 94-97, 2001.

¹¹⁵ B.K.H. 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.

más se aproxima al *LOAEL* más bajo que se ha determinado: $115 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal²³ (*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 de *LAS* a ratas. También, se consideró que la biodisponibilidad oral del *LAS* era del 80%²³, y que la absorción es vía, mayoritariamente, gastrointestinal. Teniendo en cuenta esto, el valor sistemático del *NOAEL* se fijó en $68 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal al día²³.

En el caso del *LAS*, 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 el 1% y el 50%. Aunque el *LAS* puro es irritante para ojos y piel, sus disoluciones, dependiendo de la concentración, pueden llegar a no tener dicho carácter irritante. Disoluciones con una concentración superior al 65% se consideran “tóxicas por ingestión”. Los diferentes tipos de contacto con el organismo humano pueden ser:

- Contacto directo o indirecto con la piel: Se deben tener en cuenta los hábitos de limpieza¹¹⁶ 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

¹¹⁶ AISE. *Table of Habits and Practices for Consumer Products in Western Europe*. 2002

tensioactivos aniónicos vía cutánea es bastante baja¹¹⁷ (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⁻¹, la superficie de exposición que ofrecen las manos y antebrazos se considera que es de unos 1980 cm², y que la película de disolución de detergente que permanece en contacto con la piel tiene un espesor de 100 μm (0.01cm) y permanece en contacto 24 horas en el peor de los casos. Con estas premisas se puede estimar la cantidad de *LAS* absorbido:

- Cantidad diaria de *LAS* absorbido = 1980 cm²·0.01cm·0.01 (fracción absorbida) · 2.2 mg·cm⁻³ = 0.44 mg *LAS* 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⁻¹ de peso corporal al día. Con este dato, se puede evaluar el valor del *MOE36* resultando ser de 453000.

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

¹¹⁷ 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.

Tabla 1.13- Formas de contacto directo de LAS con la piel.

Modo de exposición	Tasa de absorción ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal / día)	Margen de exposición (MOE)
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	$9.70\cdot 10^4$

- 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 de manera cotidiana. 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 1.14- Formas de contacto directo de LAS por inhalación.

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

- 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 1.15- Formas de contacto directo de LAS por ingestión.

Modo de exposición	Tasa de absorción ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal / día)	Margen de exposición (MOE)
Ingestión de agua potable	0.1	$6.8\cdot 10^5$
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.

2.4.6 - Biodegradabilidad del jabón

El estudio del comportamiento ambiental del jabón es complicado, ya que su biodegradación depende en gran medida de su solubilidad. Como se ha mencionado con anterioridad, el jabón tiene una gran tendencia a precipitar en presencia de aguas con alto contenido en sales alcalino-térreas y, por tanto, su biodisponibilidad es menor, haciendo que su biodegradabilidad esté íntimamente unida a su solubilidad¹¹⁸.

¹¹⁸ Prats D., Rodríguez M., Varo P., Moreno A., Ferrer J. *Biodegradation for soap in anaerobic digester and on sludge amended soils*. Proceedings of the 4th world surfactants congress. 3-7VI; 233-245. Barcelona, 1996.

Una vez que esta biodisponible, el jabón se degrada, en condiciones aeróbicas, de la misma manera que un ácido graso, es decir, sufre un β -oxidación para generar acetil-CoA y energía.

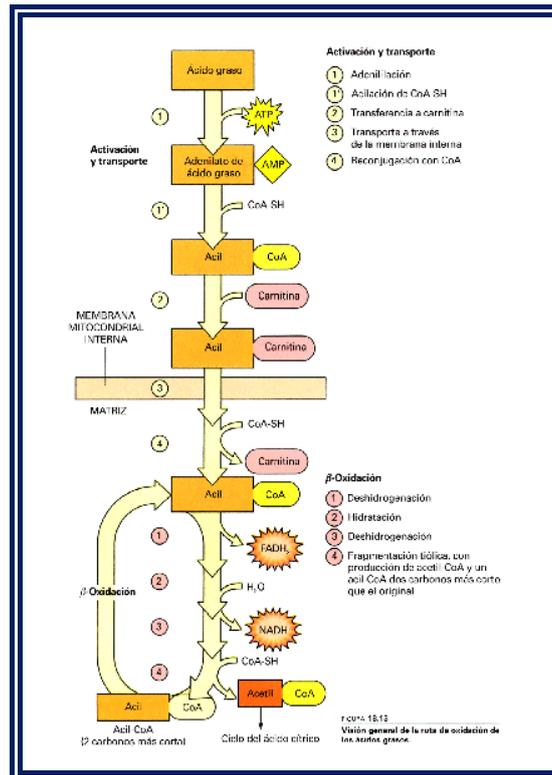


Figura 1.28- Proceso de degradación de los ácidos grasos.

Los estudios llevados a cabo^{32,119} sobre la degradación de jabón en condiciones anaeróbicas, permiten poner de manifiesto que:

¹¹⁹ L oehr R.C., Roth J.C. *Aerobic degradation of long-chain fatty acid salts*. Journal WPCF. 11. Part2: 385-403, 1967.

- El porcentaje de degradación del jabón dependía en gran medida de sus propiedades físico - químicas: solubilidad, C.M.C. y adsorción.
- La concentración de sales, fundamentalmente de tipo cálcico y magnésico, en el medio influía de manera notable en la biodegradación.
- Al aumentar la cadena alquílica, la metabolización disminuía.
- La insaturación en el jabón favorecía su biodegradación. La posición y número de insaturaciones no influía en su proceso de asimilación por el medio.
- Según los test realizados¹²⁰, los jabones de hasta longitud de cadena C₁₈ fueron considerados, bajo condiciones aeróbicas, como fácilmente biodegradables.

En la **Tabla 1.16**, se resumen los porcentajes de biodegradación obtenidos para diferentes tipos de jabón sódico en condiciones aeróbicas:

¹²⁰ *Environmental data review of soaps*. NVZ in cooperation with European surfactant industry. Delft. The Netherlands, 1994.

Tabla 1.16- Tests de biodegradación para jabón tipo sódico y potásico.

JABÓN	% BIODEGRADACIÓN	MÉTODO
C ₁₂ -Na	58	BOD5
C _{18:1} -Na	48	BOD5
C ₁₈ -Na	46	BOD5
C ₁₈ -Na	60	CO ₂ (8 días)
Sebo (C _{16/18} -Na)	75	BOD15
C ₁₈ -Na	62	CO ₂ (28 días)
C ₁₆ -Na	55	Warburg (cinco días)
C _{16/18} -Na	56	CO ₂ (8 días)
C ₁₂ -Na	58	Warburg (dos días)
C ₁₈ -Na	79	Sturm (28 días)
Sebo (C _{16/18} -Na)	89	OECD 301D ¹²¹
C _{12/18} -K	95	OECD 301D

Teniendo en cuenta la más que probable presencia de jabón tipo cálcico en el medio, se realizaron tests de biodegradabilidad específicos para este tipo de jabón¹²² en condiciones aeróbicas, los cuales, para evitar la posible insolubilización del jabón tipo cálcico, utilizaron ultrasonidos, disolventes emulsificadores y agitación continua. Los resultados demostraron un porcentaje de biodegradación casi cuantitativo. Cabe recordar que estos ensayos se hicieron en condiciones muy especiales, imposibles de reproducir en un ecosistema ambiental real.

¹²¹ Gerike P. *The biodegradability testing of poorly water soluble compounds*. Chemosphere 13; 169-190, 1984.

¹²² ECETOC. *Biodegradation test for poorly soluble compounds*. Technical report No. 20, 1986.

Tabla 1.17- Tests de biodegradación para jabón cálcico.

TEST	DURACIÓN (DÍAS)	% BIODEGRADACIÓN
Sturm	24	91
Sturm	24	99
Sturm	24	82
Sturm	20	82
Sturm	20	84
Sturm	24	88
MITI	32	91
MITI	32	93

- Biodegradación en agua superficial

Existe sólo un informe³² que nos aporta datos sobre la posible degradación en estas condiciones. Los resultados mostraron que para dos concentraciones de partida fijas ($7.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $24.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y para un ensayo de 20 días, se obtuvieron porcentajes de biodegradación del 100 % para una mezcla de jabón sódico con diferentes tipos de cadenas alquílicas. A través de los datos obtenidos, se pudo calcular los tiempos de vida media para cada longitud de cadena.

Tabla 1.18- Tiempos de vida media para el jabón sódico en agua superficial.

JABÓN-Na	T _{0.5} a 7.3mg·L ⁻¹ (Horas)	T _{0.5} a 24.7 mg·L ⁻¹ (Horas)
C ₈	15	25
C ₁₀	24	19
C ₁₂	13	18
C ₁₄	33	47
C ₁₆	59	70
C ₁₈	62	70
C _{18.1}	57	54
C _{18.2}	33	42

Teniendo en cuenta la diferencia que hay en los tiempos de vida media para ambas concentraciones, se consideró, para estudios posteriores de impacto ambiental³², el valor dado por la concentración más baja como el verdadero, ya que esa concentración se asemeja más a la encontrada en ecosistemas reales.

- Biodegradación bajo condiciones anaerobias

Los tests llevados a cabo¹²², se basaban en la digestión del jabón bajo condiciones anóxicas, las cuales se propiciaban mediante el uso de inóculos provenientes de lodos activados de depuradora. En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos por estos tests:

Tabla 1.19- Tests de biodegradación anaerobios para el jabón.

JABÓN	CADENA	TEST	DURACIÓN (Días)	% BIO.
Sódico	12	Semicontinuo	20	95
Sódico	12	ECETOC	54	100
Cálcico	12	Agitación	5-6	90
Sódico	16	ECETOC	28	94
Sódico	8-18	Semicontinuo	20	67
Sódico sebo	16-18	Semicontinuo	20	60
Sódico	18	Semicontinuo	20	51
Cálcico	18	Agitación	10	85
Sódico	18:1	Semicontinuo	20	69

Los resultados demuestran que el jabón se degrada en condiciones anaerobias, en cualquiera de sus especies y longitudes de cadena, siempre y cuando se de las condiciones de laboratorio idóneas para mantener al jabón tipo cálcico soluble. Del mismo modo, se puede apreciar en los ensayos que el jabón se descompone hasta su degradación última ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$). De momento, no se conoce los posibles intermedios de biodegradación anóxicos (biodegradación primaria) que pudiera generar el jabón.

- Biodegradación en suelos

Los lodos de EDAR, los cuales tienen un alto contenido en jabón, se utilizan, en muchos casos, para enmendar suelos de origen agrícola. Prats¹¹⁸ calculó las constantes de degradación en los suelos agrícolas

después de aplicar en ellos lodos de EDAR. El resultado obtenido se resume en la tabla que viene a continuación:

Tabla 1.20. Tiempos de vida media y constante de degradación para el jabón en suelos agrícolas.

$t_{0.5}$ (días)	k (días ⁻¹)
36	0.0191

2.4.7 - Eliminación y monitorización del jabón

Del mismo modo que el resto de los tensioactivos, la principal vía de eliminación del jabón es a través del vertido en aguas domésticas e industriales. Una vez en el medio, aquella parte de jabón que no se ha degradado de manera aeróbica en las aguas superficiales (ver apartado anterior), va a pasar por un proceso de depuración en las plantas EDAR.

Actualmente, sólo existe un estudio, realizado en 1996 por *Prats*¹¹⁸, en el cual se monitorizó el comportamiento del jabón desde su deshecho al sistema de alcantarillado, hasta su salida (efluentes) de las plantas EDAR, pasando, también, por su análisis en la entrada de la estación depuradora.

Para todas las muestras acuosas analizadas se encontraron concentración de jabón por debajo de 0.1 mg·L⁻¹; sin embargo, los sólidos en suspensión de esas aguas presentaban concentraciones de jabón entorno al 15% en masa. Este hecho se debía a la gran tendencia que tenía el jabón a precipitar y a adsorberse. El calculo que se hizo del tratamiento de agua residual, por medio de balance de materia, desde el influente hasta el influente, arrojó como resultado que el 99.7% de jabón se degrada durante

todo el proceso llevado a cabo en la planta EDAR. Este resultado es similar al obtenido por *Matthijs*¹²³.

Si nos centramos más en el proceso anaeróbico, tras analizar la entrada y salida del digester anaerobio, los resultados de Prats mostraron una biodegradación aproximada del 70%. Estos datos difieren bastante de los obtenidos en los ensayos de laboratorio, en donde el porcentaje de degradación anaerobia es entorno al 90%.

En la siguiente **Figura 1.29**, se resumen el estudio que llevó a cabo *Prats*. Del igual manera, la tabla posterior muestra de forma resumida los datos obtenidos en este estudio:

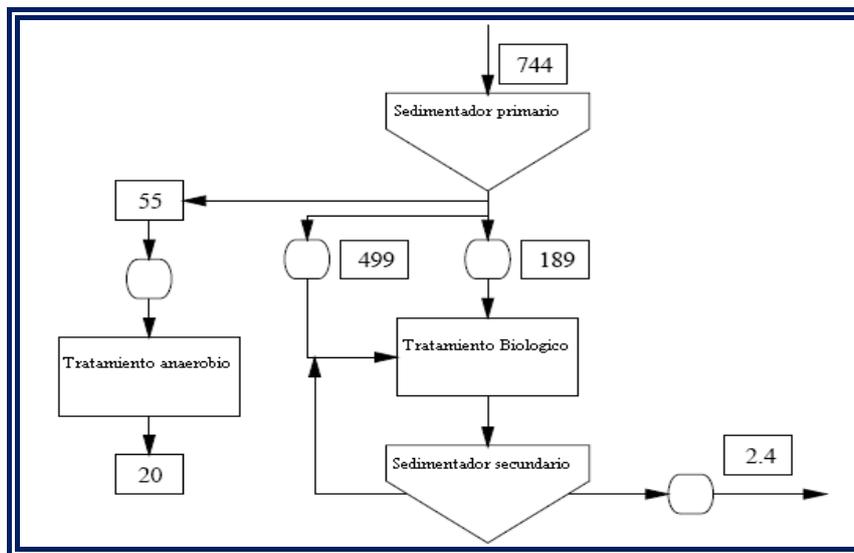


Figura 1.29- Esquema del proceso de eliminación de jabón en plantas EDAR. Datos en Kg.

¹²³ Matthijs E., Holt M., Kiewiet A., Rijs G. *Fate of surfactants in activated sludge waste water treatment plants: outcome of field studies on Linear Alkylbenzene sulphonate, alcohol ethoxylate, alcohol ethoxy sulphate, alcohol sulphate and soap*. Proceedings of the 4th world surfactants congress. 3-7VI: 81-86. Barcelona, 1996.

Tabla 1.21. Resultados obtenidos por la monitorización de jabón en plantas EDAR.

JABÓN	INFLUENTE		EFLUENTE		ELIMI. TOTAL (%)
	%	Masa (Kg·día ⁻¹)	%	Masa (Kg·día ⁻¹)	
C ₁₂	6.3	47	7.0	0.17	99.7
C ₁₄	3.3	25	2.6	0.062	99.7
C ₁₆	27	200	28	0.67	99.7
C₁₈ (total)	63	470	62	1.5	99.7

2.4.8 - Actividad ambiental del jabón

Al igual que el *LAS*, el riesgo ambiental del jabón se mide a través del cociente entre *PEC* y el *PNEC*. Los valores obtenidos para el jabón en diferentes ecosistemas son inferiores a la unidad, indicando su baja peligrosidad desde el punto de vista ambiental. Existe sólo un tipo de jabón en donde se supera la unidad, el C₁₂. Este valor anómalo se achaca en el propio estudio³⁴ a la falta de datos fiables, ya que los datos recopilados hasta la fecha son muy escasos, por lo que se tuvieron que hacer muchas extrapolaciones para calcular tanto los valores de *PEC* como de *PNEC*, impidiendo sacar conclusiones claras. Por lo tanto, a falta de resultados más fiables, hay que tomar con precaución los resultados que se muestra a continuación.

Tabla 1.22- Relación PEC/PNEC del jabón en diferentes medios ambientales.

PEC/PNEC	AGUA	SUELO	SEDIMENTO	EDAR
C ₁₀	0.0143	2.083·10 ⁻³	0.0163	5.66·10 ⁻⁴
C ₁₂	1.19	1.59	1.34	0.0192
C ₁₄	0.426	0.433	0.481	6.09·10 ⁻³
C ₁₆	0.543	0.173	0.612	8.93·10 ⁻³
C ₁₈	0.707	0.0330	0.797	0.0164
C ₂₂	1.24·10 ⁻³	2.61·10 ⁻⁵	1.39·10 ⁻³	4.12·10 ⁻⁴

Para finalizar, en cuanto al posible riesgo del jabón para la salud humana, un estudio¹²⁴ calculó los valores *MOE*, dando como resultado, en el peor de los casos, de 258.620. Este tremendo margen fue calculado mediante todos los posibles escenarios de exposición. Por lo tanto, en el estudio se concluyó que el jabón no presentaba ningún riesgo para la salud humana en ninguno de sus posibles escenarios.

2.5 - Métodos para la determinación del *LAS* y el jabón

2.5.1 - 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

¹²⁴ Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products (HERA). *Fatty Acids Salts (soap) Human Health Risk Assessment*, 2002.

o eliminar posibles interferentes. A continuación se describen brevemente algunos de los más empleados:

- Métodos volumétricos

Son escasos los métodos propuestos de este tipo. Como representación de ellos, destaca el descrito por *Thuman*¹²⁵, 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 erio Glaucina en etanol. La mezcla de tensioactivos aniónicos es valorada antes y después de un proceso de hidrólisis para distinguir así entre *SDS* y *LAS*.

- Métodos espectrométricos

Dentro de este apartado, se pueden distinguir métodos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos, los cuales suelen ser poco selectivos y están sometidos a numerosas interferencias. Los primeros se basan en la formación de un complejo coloreado con el tensioactivo aniónico. Entre ellos se puede citar:

¹²⁵ 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.

- Determinación de sustancias activas con el azul de metileno (*Methylene Blue Active Substances - MBAS*), es el método de análisis colorimétrico más 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 selectivos¹²⁶ (*HPLC*), comprobándose que sólo una fracción de la concentración obtenida mediante este método es debida al *LAS*.

- Determinación de tensioactivos aniónicos mediante la formación del complejo con tris (1,10 fenantrolina) · Fe. El límite de detección, para este método es de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cuando la determinación se lleva a cabo colorimétricamente, aunque cabe la posibilidad de utilizar *espectrometría de absorción atómica en horno con grafito*¹²⁷; con este sistema de medida el límite de detección es de $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

¹²⁶ Matthijs E., de Henau H.. *Determination of LAS in aqueous samples, sediments, sludges and soils using HPLC*. Tenside Surf. Det. 24; 193-199, 1987.

¹²⁷ 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.

- Determinación de tensioactivos aniónicos basada en la extracción del complejo formado entre el tensioactivo y el (bis) etilendiamina Cu (II) en cloroformo¹²⁸. 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)¹²⁹.

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 ambientales (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*¹³⁰, para la determinación de tensioactivos aniónicos. Está basado en la formación de un par iónico con Rodamina-B en medio HCl 0.5 N que es extraído con benceno, el método presenta un intervalo lineal comprendido de $0.02 - 0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y se aplica a aguas residuales urbanas con índices de recuperación próximos al 100%.

¹²⁸ 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.

¹²⁹ 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.

¹³⁰ Rubio-Barroso S., Gomez-Rodriguez M., Polo-Diez L.M. *Fluorimetric Determination of Anionic Surfactants by Extraction as the Rhodamine-B ion pair*. Microchem. J. 37; 93-98. 1988.

- Métodos separativos: Cromatografía de gases

Este tipo de cromatografía permite la detección de analitos que sean suficientemente volátiles o que pueden llegar a serlo mediante una adecuada reacción de derivación. 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 derivación previo a su análisis. Este proceso de derivación se puede llevar a cabo mediante el empleo de diversos agentes derivantes: Tetrabutilamonio hidrogeno sulfato (TBA), Tetraetilamonio hidrogeno sulfato (TTEA), Tetrametilamonio hidrogeno sulfato (TMA), hidróxido de trimetilfenilamonio (TFMPA), hidróxido de (trifluorometil) fenilamonio (TMPA)¹³¹, Cl₅P + trifluoro etanol¹³², anhídrido trifluoro acético¹³³ e incluso desulfonación directa en medio ácido¹³⁴. También es posible realizar el proceso de derivación en el puerto de inyección. Consiste en someter extractos clorofórmicos provenientes de discos C₁₈ a la acción de un agente derivante en el propio vial. Estos extractos una vez inyectados, generan, en el inyector, el correspondiente éster¹³⁵.

Mediante estos procedimientos se forman los derivados volátiles de los diferentes isómeros y homólogos del LAS neutralizando o eliminando el

¹³¹ 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 Ionpair/supercritical fluid extraction and derivatization GC/MS*. Anal. Chem. 64; 3161-3167, 1992.

¹³² 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.

¹³³ Pratesi C.R., Facceti L., Cassani G. *Anionic surfactants composition by GC/MS*. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. vol LXXVIII; 273-278, 2001.

¹³⁴ Osburn Q.W. *Analytical methodology for LAS in water and wastes*. J. Am. Oil Chem. Soc. 63; 257-263, 1986.

¹³⁵ Krueger C.J., Field J.A. *In-vial C18 empore disk elution coupled with injection port derivatization for the cuantitative determination of LAS by GC-FID*. Anal. Chem. 67; 3363-3366, 1995.

grupo polar $-\text{SO}_3$ - responsable de la baja volatilidad del *LAS*. En la bibliografía mencionada se utiliza como sistema de detección la *espectrometría de masas*, además, de detectores de ionización de llama (*FID*)¹³⁶, 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 1.23**.

Tabla 1.23- Métodos de análisis del LAS mediante cromatografía de gases.

Detector	Matriz	Límite de Detección ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Espectrometría de masas	Fangos residuales	Identificación
Espectrometría de masas	Muestras acuosas y sólidas	25
Espectrometría de masas	Patrones	Identificación
Ionización por llama	Muestras acuosas y sólidas	-
Ionización por llama	Aguas residuales	1500
Espectrometría de masas ¹³⁶	Sedimentos	50
Espectrometría de masas ¹³⁷	Aguas residuales	1000
Espectrometría de masas ¹³⁸	Sedimentos de lago	3-42

Previo al análisis cromatográfico, se debe incluir una etapa de extracción y purificación que permita extraer el analito de la matriz ambiental donde se encuentre, además de eliminar posibles interferentes que le acompañen. Para este propósito¹³², se han empleado sistemas de extracción que utilizan fluidos supercríticos, extracción Soxhlet, etc.

¹³⁶ 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.

¹³⁷ 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.

¹³⁸ Reiser R., Toljander O., Giger W. *Determination of LAS in recent sediments by GCMS*. Anal. Chem. 69; 4923-4930, 1997.

- Métodos separativos: 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 derivación.

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), quiral, 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, lo que 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 quiral 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 **Tabla 1.24**, se muestran los más significativos.

Tabla 1.24- Métodos de análisis del LAS mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Matriz	Tipo de cromatografía	Detección	Límite de detección
Muestras acuosas, fango, sedimento y suelos ¹²⁷	Fase inversa	Absorbancia (UV)	10 mg·L ⁻¹
Muestras acuosas ¹³⁹	Fase inversa	Fluorescencia	80 µg·L ⁻¹
Agua marina ¹⁴⁰	Fase inversa	Fluorescencia	2 µg·L ⁻¹
Aguas residuales brutas y tratadas; lodos ¹⁴¹	Fase inversa	Espectrometría de masas	0.4-2.5 µg·Kg ⁻¹
Aguas fluviales tratadas con microbios ¹⁴²	Fase inversa	Espectrometría de masas	Identificación
Agua marina y de estuario ¹⁴³	Fase inversa	Fluorescencia	0.9 µg·L ⁻¹
Aguas industriales ¹⁴⁴	Fase inversa (Par iónico)	Espectrometría de masas	4.5 µg·L ⁻¹
Agua marina ¹⁴⁵	Fase inversa	Absorbancia (UV)	100 µg·L ⁻¹
Sedimentos ¹⁴⁶	Fase inversa	Fluorescencia	Identificación

¹³⁹ Castles M.A., Moore B.L., Ward S. *Measurement of LAS in aqueous environmental samples by HPLC-FD*, Anal. Chem. 61; 2534-2540, 1989.

¹⁴⁰ León V.M., Gómez-Parra A., González-Mazo E. *Determination of SPC in marine samples by SPE then HPLC*. J. Anal. Chem 371; 479-485, 2001.

¹⁴¹ 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.

¹⁴² Knepper T.P., Kruse M. *Investigations into the formation of SPC from LAS by LC-MS*. Tenside Surf. Det. 37; 41-47, 2000.

¹⁴³ 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.

¹⁴⁴ Alonso M.C., Castillo M., Barceló D. *SPE procedure of polar benzene and naphthalene sulfonates in industrial effluent followed by unequivocal determination with ion-pair chromatography/electrospray MS*. Anal. Chem 71; 2586-2593, 1999.

¹⁴⁵ 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 1.24- Métodos de análisis del LAS mediante cromatografía líquida de alta resolución. (cont.)

Matriz	Tipo de cromatografía	Detección	Límite de detección
Patrones ¹⁴⁷	Intercambiador aniónico	Conductividad	14 pmol
Aguas residuales industriales ¹⁴⁸	Fase inversa (Par iónico)	Absorbancia (UV)	100 µg·L ⁻¹
Aguas residuales industriales ¹⁴⁹	Fase inversa (Par iónico)	Absorbancia (UV)	254 µg·L ⁻¹
Aguas residuales urbanas ¹⁵⁰	Fase inversa	Fluorescencia	Identificación
Agua de grifo, fluvial, etc. ¹⁵¹	Intercambiador aniónico	Absorbancia (UV)	Identificación
Muestras acuosas ¹⁵²	Fase inversa	Fluorescencia	8 µg·L ⁻¹
Aguas fluviales ¹⁵³	Fase inversa	Absorbancia (UV)	Identificación
Fangos y sedimentos ¹⁵⁴	Fase inversa	Fluorescencia	80 ng

¹⁴⁶ 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.

¹⁴⁷ Pan N., Pietrzyk D.J. *Separation of anionic surfactants on anion exchangers*. J. Chrom. A. 706; 327-337, 1995.

¹⁴⁸ 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.

¹⁴⁹ 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.

¹⁵⁰ 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.

¹⁵¹ Yokoyama Y., Kondo M., Sato H. *Determination of alkylbenzenesulphonates in environmental water by anion exchange chromatography*. J. Chrom. 643; 169-172, 1993.

¹⁵² Di Corcia A., Marchetti M., Samperi R. *LC determination of LAS in aqueous environmental samples*. Anal. Chem. 63; 1179-1182, 1991.

¹⁵³ 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.

Cabe destacar que la mayoría de las determinaciones se realizan en matrices ambientales (aguas fluviales, marinas, sedimentos, fangos, etc.), utilizando, como etapa previa la extracción Soxhlet o el baño de ultrasonidos para matrices sólidas (sedimentos, suelos, etc.) o la extracción en fase sólida con adsorbentes de diversa naturaleza (C_8 , C_{18} , *SAX*, etc.) para muestras acuosas. Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios métodos en los que se emplean otras técnicas de extracción tales como el ultrasonidos de alta potencia¹⁵⁵, Soxhlet asistido por microondas¹⁵⁶ o microondas¹⁵⁷. Del mismo modo, algunas referencias desarrollaron metodologías sin extracción en fase sólida (*SPE*)^{158,158}.

- Métodos separativos: 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 a que el ensanchamiento de la banda correspondiente al analito sea mucho menor.

¹⁵⁴ Marcomini A., Giger W. *Simultaneous determination of LAS, alkylphenol polyethoxilates, and nonylphenol by HPLC*. Anal. Chem. 59; 1709-1715, 1987.

¹⁵⁵ Nimer M., Ballesteros O., Navalón A., Crovetto G., Verge C., López I., Berna J.L., Vilchez J.L. *New sample treatment for determination of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in agricultural soils by liquid chromatography with fluorescence detection*. Anal Bioanal Chem. 387; 2175–2184, 2007.

¹⁵⁶ Morales-Muñoz S., Luque-García J.L., Luque de Castro M.D. *Screening method for linear alkylbenzene sulfonates in sediments based on water Soxhlet extraction assisted by focused microwaves with on-line preconcentration/ derivatization/ detection*. Journal of Chromatography A, 1026; 41–46, 2004.

¹⁵⁷ Villar M., Callejón M., Jiménez J.C., Alonso E., Guiráum A. *Optimización and validation of new method for análisis of linear alkylbenzene sulfonates in sewage sludge by liquid chromatography alter microwave-assisted extraction*. *Analytica Chimica Acta* 599; 92-97, 2007.

¹⁵⁸ Santos J.L., Aparicio I., Alonso E. *A new method for the rutine análisis of LAS and PAH in sewage sludge by simultaneous sonicated-assisted extraction prior lo liquid chromatographic determination*. *Analytica Chimica Acta*. 605; 102-109, 2007.

En bibliografía se han encontrado pocos trabajos que utilicen esta técnica para la determinación de LAS.

En la **Tabla 1.25**, se recogen la mayoría de ellos:

Tabla 1.25- Métodos de análisis del LAS mediante electroforesis capilar.

DETECTOR	MATRIZ	LÍMITE DE DETECCIÓN
Espectrometría de masas ¹⁵⁹	Aguas residuales	4 µg·L ⁻¹
Espectrometría de masas y absorbancia (UV) ¹⁶⁰	Aguas residuales y costeras	1 µg·L ⁻¹
Absorbancia (UV) ¹⁶¹	Lodos residuales	4000 µg·L ⁻¹
Absorbancia (UV) ¹⁶²	Patrones	12000 µg·L ⁻¹
Absorbancia (UV) ¹⁶³	Agua de río, lodos	Identificación
Absorbancia (UV) ¹⁶⁴	Lodos	34 µg·L ⁻¹
Absorbancia (UV) ¹⁶⁵	Patrones, productos fab.	Identificación
Absorbancia (UV) ¹⁶⁶	Agua de río	4800 µg·L ⁻¹

¹⁵⁹ 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.

¹⁶⁰ 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.

¹⁶¹ Heinig K., Vogt C., Werner G. *Determination of LAS in industrial and environmental samples by Capillary electrophoresis*. Analyst 123; 349-353, 1998.

¹⁶² 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.

¹⁶³ Heinig K., Vogt C., Werner G. *Separation of ionic and neutral surfactants by CE and HPLC*. J. Chrom. A 745; 281-292, 1996.

¹⁶⁴ 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.

¹⁶⁵ Desbène P.L., Rony C., Desmazières B., Jacquier J.C. *Analysis of alkylaromatic sulphonates by HPCE*. J. Chrom. A. 608; 375-383, 1993.

¹⁶⁶ 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.

En la bibliografía anteriormente citada, se describe un fenómeno por el cual las moléculas de *LAS* y de otros tensioactivos aniónicos (ej: dodecilsulfato sódico - *SDS*) sufren un proceso denominado “asociación solvofóbica”¹⁶⁷, 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*. La separación puede tener lugar, basándose en la formación de complejos de diferente fortaleza, dependiendo de la hidrofobicidad de cada componente.

2.5.2 - Métodos para la determinación del jabón

En términos generales, puede decirse que el número de métodos analíticos propuestos para la determinación de jabón es escaso. La mayoría de las metodologías desarrolladas se basan en métodos oficiales de análisis (ASTM 40D^{168,169}, AOCS official methods section D¹⁷⁰, ASTM D80¹⁷¹), que son utilizados en la industria del jabón para el control de la calidad del producto.

¹⁶⁷ Shi Y., Fritz J.S. *HPCZE of nonionic compounds using a novel anionic surfactant additive*. Anal. Chem. 67; 3023-3027, 1995.

¹⁶⁸ Wood T.E. *Analytical methods, evaluation techniques, and regulatory requirements*, in L. Spitz, ed., *Soap Technology for the 1990s*. American Oil Chemist Society. Champaign. IL, 1999.

¹⁶⁹ American Society for Testing and Materials (ASTM). *Sampling and Chemical analysis of soaps and soap products*, D460-91. West Conshohocken. PA 19428. 1988

¹⁷⁰ American Oil Chemist Society (AOCS). *Official and tentative methods. Section D: Sampling and analysis of soap and soap products*. 221 West Bradley Ave. Champaign. IL 61826. 1985.

¹⁷¹ American Society for Testing Materials, (ASTM). *Chemical analysis of soaps containing synthetic detergents*. D820-93. West Conshohocken. PA 1942, 1988.

Dentro de estos protocolos cabe destacar los siguientes ensayos que se suelen hacer sobre el jabón en laboratorio de control de calidad:

- *Total de Ácidos Grasos.* La muestra se hidroliza con ácido, se extraen con éter los ácidos grasos, se evapora el éter y se calcula el resultado mediante pesada del residuo.
- *Color.* El color del jabón está estrechamente relacionado con el color de los ácidos grasos obtenidos de la muestra por hidrólisis y lavado. El color de los ácidos grasos se compara con colores estandarizados. Los ácidos grasos de colores claros se relacionan, en columna de 5.25" (13.3 cm), con los colores tipo en el tintómetro de Lovibond. Por otro lado, los ácidos de color oscuro se comparan con la escala de color de la *FAC* (del inglés *Fat Analysis Committee* de la American Oil Chemists' Society).
- *Álcali libre.* Se disuelve una muestra en alcohol y se valora con una disolución de ácido, empleando fenolftaleína como indicador. El resultado se expresa en cantidad de Na_2O .
- *Glicerina.* La principal impureza de la síntesis tradicional del jabón (saponificación de grasas) es la glicerina. La concentración (0.4% -3%) de glicerina en el producto final afecta a la textura y a otras propiedades del jabón sólido, por lo tanto, su control, durante el proceso de fabricación de jabón en barra, es fundamental. Existen varias metodologías para el análisis de la glicerina basadas en diferentes técnicas analíticas:

➤ *Cromatografía de Gases (GC)*. Se mezclan 10 gramos de jabón con 200 mL de N,N- dimetilformamida. Se filtra una alícuota (50 mL) de la disolución y se añade 0.25 mL de bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida en un vial de reacción. Finalmente se inyecta un microlitro en el cromatografo (detector FID)¹⁷².

➤ *Cromatografía líquida (CL)*. Se mezclan 5 gramos de jabón con 50 mL de fase móvil, a continuación, se filtra la disolución y se añade 1,2,4- butanotriol como patrón interno. Para finalizar, se inyecta la disolución resultante en el cromatografo (detector de índice de refracción)¹⁷³.

➤ *Espectrofotometría*. Se tratan dos o tres gramos de jabón en una mezcla de ácido sulfúrico y agua, se calienta y agita la disolución hasta la aparición de una capa de ácidos grasos. Los ácidos grasos se extraen con éter de petróleo. Se filtra la disolución acuosa y se diluye con agua hasta un volumen de 100 mL. En un matraz de 100 mL se pipetea dos mililitros de la disolución anterior y 1mL de disolución 0.03 M de periodato sódico 0.03 M en ácido sulfúrico. La glicerina se oxida a formaldehído y a ácido fórmico. El siguiente paso, consiste en añadir al matraz 1mL de HCl concentrado y 10 mL de una disolución compuesta por 0.23 g de 1,8-dihidroxinaftaleno diluido a 250 mL con ácido sulfúrico. Para

¹⁷² Molever K. *Glycerin in soap by capillary gas Chromatography*. J.Am.Oil.Chem.Soc. 64; 1356-1357, 1987.

¹⁷³ George E.D., Acquaro J. *HPLC for the analysis of glycerol and other glycols in soap*. J. Liq. Chromatogr. 5; 927-938, 1982.

finalizar, la disolución se calienta durante 30 minutos y se mide en el espectrofotómetro a 571 nm¹⁷⁴.

A parte de los análisis rutinarios en el laboratorio, existen algunas referencias relativas a la determinación de la cantidad total de jabón por cromatografía de gases y por cromatografía líquida, fundamentalmente, usando para ello la premisa de que el jabón, en disolución, se asemeja, desde un punto de vista analítico, a un ácido graso. Por tanto, se pueden usar las mismas técnicas de análisis que se usan para determinar los ácidos grasos.

Debido a que un ácido graso no se puede determinar por métodos convencionales de manera directa (alto punto de ebullición, ausencia de absorbancia y fluorescencia nativa), estos métodos están basados en la conversión, mediante una reacción de derivación adecuada, del ácido graso proveniente del jabón en un derivado capaz de ser determinado mediante las técnicas de detección habituales. Entre los reactivos más usados cabe destacar el BF₃ en metanol.^{175,176,177,178,179,180}

¹⁷⁴ International Organization for Standardization. *Surface active agents- soap-determination of low contents of free glycerol by molecular absorption spectrometry*. ISO 2272:1989. Geneva. Switzerland, 1989.

¹⁷⁵ Janda V., Pehal F. *Isolation, concentration, and Gas Chromatographic Determination of C₁₄-C₁₂ fatty acids in water and sludge*. J. High Resolution Chromatography. Vol.7. 540-541, 1984.

¹⁷⁶ Vioque E., Maza M.P., Millán F. *High-Performance Liquid Chromatography of fatty acids as their p-phenylazophenacyl esters*. J Chromatography. 331; 187-192, 1985.

¹⁷⁷ Mukherjee P.S., Karnes H.T. *Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acid for high performance liquid chromatography: a Review*. Biomedical Chromatography. Vol 10; 193-204, 1996.

¹⁷⁸ González-Casado A., Alonso E.J., Vilchez J.L. *Determination of fatty acid (C₈-C₂₂) in urban waste water by GC-MS*. Wat. Res. Vol.32; 3168- 3172, 1997.

¹⁷⁹ González-Casado A., Del Olmo M., Alonso E.J., Vilchez J.L. *Determination of fatty acid (C₈-C₂₂) in toilet soap and laundry detergents by GC-MS*. Química Analítica. 18; 203-207, 1999.

La escasez de metodologías, se hace más acusada, si cabe, cuando se busca referencias sobre la determinación de jabón en matrices ambientales^{181,182,183}. Esta carencia, se debe al peculiar comportamiento del jabón en el medio, ya que, como se ha comentado antes, en presencia de sales cálcicas y/o magnésicas, el jabón tiende a precipitar; y estas sales, destacan, por encima de cualquier cosa, por su baja solubilidad, dificultando su análisis e imposibilitando cualquier tipo de reacción de derivación típica de ácidos grasos. Al objeto de resolver este grave inconveniente en la presente Memoria se ha desarrollado un procedimiento para transformar dichas sales, previa extracción del material lipídico, en sales potásicas mediante reacción con AEDT y carbonato potásico.

¹⁸⁰ González-Casado A., Del Olmo M., Alonso E.J., Espinosa P., Vilchez J.L., (1998). *Determination of fatty acid (C₈-C₂₂) in sludges by GC-MS*. J Chromatography A. 826; 49-56, 1998.

¹⁸¹ Hayashi K., Kawase J., Yoshimura K., Ara K., Tsuji K. *Determination of trace levels of fatty acid metal salts by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence prelabelling*. Analytical Biochemistry. 136; 314-320, 1983.

¹⁸² Moreno A., Bravo J., Ferrer J., Bengoechea C. *Soap determination in sewage sludge by High-Performance Liquid Chromatography*. JAOCS. 70. 667, 1993.

¹⁸³ Folke J., Gilleleje G., Cassani G., Ferrer J., López I. *Linear Alkylbenzene Sulphonates, branched Dodecylbenzene Sulphonates and soaps analysed in marine sediments form de Baltic proper and little belt*. Tenside Surf. Det. 40; 1, 2003.

3.- LA VEGA DE GRANADA

3.1 - 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 procedentes de la Sierra Nevada.

3.2 - 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 central¹⁸⁴.

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 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, respectivamente¹⁸⁵.

Actualmente, se ubican una treintena de poblaciones, incluida Granada capital, se concentra una población estable de alrededor de 500,000 habitantes. 40,000 personas dependen, exclusivamente, del abastecimiento de aguas subterráneas, y existe una intensa explotación agrícola que abarca una superficie de regadío de más de 15.000 ha. Los cultivos más extendidos corresponden a cereal, choperas, hortalizas, maíz y tabaco.

¹⁸⁴ Castillo A. *Estudio hidroquímico del acuífero de la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada. Granada. España. p. 658, 1986.

¹⁸⁵ Castillo A. *El embalse subterráneo de la Vega de Granada, uno de los más importantes de Andalucía*. Tierra y Tecnología 9; 37-42, 1995.

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.

3.3 - 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 nitratos¹⁸⁷, 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 más destacable es por plaguicidas. En estudios realizados en la década de los 80, ya se mencionaban contaminaciones por plaguicidas organoclorados (OCIs)¹⁸⁶. Agustín¹⁸⁷, en 1983, encuentra importantes contaminaciones por plaguicidas OCIs en las aguas superficiales y suelos de cultivo. Los plaguicidas OCIs presentan una elevada persistencia y hoy en día su uso se halla muy restringido o, incluso, prohibido.

¹⁸⁶ Acuña M.J. *Contaminación por plaguicidas organoclorados en la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada. Granada. España. p. 380, 1981.

¹⁸⁷ Agustín 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.

En un estudio realizado en aguas de la zona saturada del acuífero entre los años 1993 y 1994¹⁸⁸, sólo se encontraron 10 contaminaciones cercanas o superiores al nivel establecido por la Unión Europea ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)¹⁸⁹, 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 un herbicida derivado de la 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 hídrico que recibe el acuífero y de la cantidad de riegos que se apliquen 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 Flury¹⁹⁰:

¹⁸⁸ 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.

¹⁸⁹ Steenhuis T.S., Staubitz W., Andreini M.S., Surface J., Richard T.L., Paulsen R., Pickering N.B., Hagerman J.R., Geohring L.D. *Preferential movement of pesticides and traces in agricultural soils*. J. Irrig. Drain. Eng. 116; 50-66, 1990.

¹⁹⁰ Flury M. *Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. A review*. J. Environ. Qual. 25; 25-45, 1996.

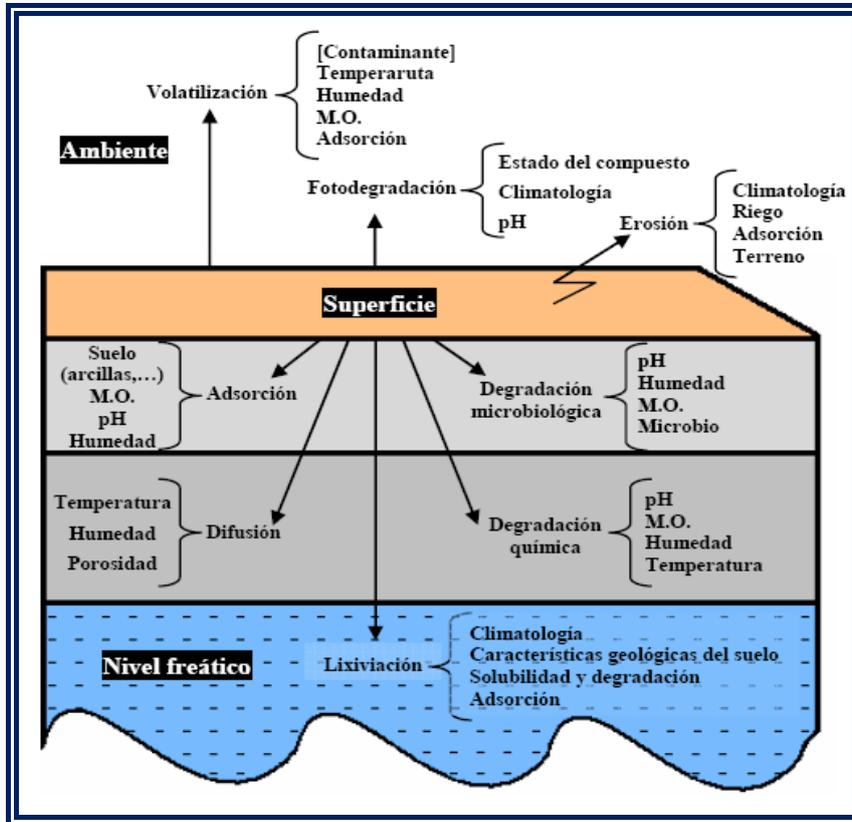


Figura 1.30- Procesos que afectan al transporte de contaminantes en el suelo.

CAPÍTULO 2
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 presente 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

A continuación se recogen todas las disoluciones utilizadas a lo largo del trabajo experimental.

➤ Disoluciones patrón:

Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón correspondiente mostradas en la **Tabla 2.1.** y posterior disolución en isopropanol, en el caso de los jabones cálcicos; y en metanol, en el caso del *LAS*, los jabones potásicos y los ácidos grasos.

Las disoluciones se conservaron en frigorífico, en botes de cristal ámbar para evitar la acción de la luz y a una temperatura de 4 °C. Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la señal analítica correspondiente y se comprobó que no existían diferencias superiores al 5 % en la señal obtenida para las distintas disoluciones, durante un periodo de al menos seis meses.

Tabla 2.1- Sustancias patrón.

PATRÓN	PUREZA (%)	FABRICANTE	C (mg · L ⁻¹)
<i>LAS</i> *	44.05	Cepsa- Química	1000
2ØC ₈	97.6	Cepsa-Química	100
2ØC ₁₆	90.0	Cepsa-Química	100
C ₈ K	98.72	Sintetizado	100
C ₁₀ K	99.05	Sintetizado	100
C ₁₂ K	97.72	Sintetizado	100
C ₁₃ K	99.32	Sintetizado	100
C ₁₄ K	98.45	Sintetizado	100
C ₁₆ K	99.13	Sintetizado	100
C ₁₈ K	97.89	Sintetizado	100
C _{18:1} K	99.34	Sintetizado	100
C ₈ -C _{18:1} Ca	94-98	Sintetizado	50
C ₈ -C _{18:1}	97-99	Merck	100

* En la **Tabla 2.2**, se muestra la distribución porcentual de los diferentes componentes del *LAS* para un índice activo de 44.05%.

Tabla 2.2- Distribución de isómeros y homólogos de la mezcla patrón de LAS.

HOMOLOGOS	ISÓMEROS	%(m/m)
C ₁₀	5ØC ₁₀	4.91
	4ØC ₁₀	3.63
	3ØC ₁₀	2.94
	2ØC ₁₀	2.66
C ₁₁	5+6ØC ₁₁	14.78
	4ØC ₁₁	7.23
	3ØC ₁₁	5.67
	2ØC ₁₁	5.04
C ₁₂	5ØC ₁₀	15.38
	4ØC ₁₀	5.79
	3ØC ₁₀	4.65
	2ØC ₁₀	3.92
C ₁₃	5+6ØC ₁₁	13.38
	4ØC ₁₁	4.06
	3ØC ₁₁	3.19
	2ØC ₁₁	2.77

2.2 - Reactivos

- **2,4 Dibromoacetofenona [DAP]** (Merck, Darmstadt, Alemania).
- **18-Éter-6-Corona** (Merck).
- **4-Bromometil-7-metoxicumarina [BrMMC]** (Sigma- Aldrich, Madrid, España).
- **Carbonato potásico** (Panreac, Barcelona, España)
- **Cloruro cálcico** (Panreac).
- **Dodecilsulfato sódico [SDS]** (Panreac).
- **Fosfato hidrógeno dipotásico** (Sigma).
- **Formaldehído PA, 37-38%**. Este reactivo se utilizó para inactivar la acción bacteriana cuando se procesaban las muestras medioambientales.
- **Ácido acético glacial PRS** (Panreac).
- **Ácido fórmico PA** (Panreac).
- **Ácido trifluoroacético PRS** (Fluka).
- **Ácido fosfórico PA, 85 %** (Panreac).

2.3 - Gases

- **Helio** calidad ALFAGaz 99.999% de pureza (Air Liquide)
- **Nitrógeno** calidad ALFAGaz 99.999% de pureza (Air Liquide).

2.4 - Disolventes

- 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 $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- **Acetona** grado HPLC (Merck).
- **Metanol** grado HPLC (Merck).
- **Metanol** PRS (Panreac).
- **Acetonitrilo** grado HPLC (Panreac).
- **2-propanol** grado HPLC (J. T. Baker, Deventer, Holanda).
- **Etilenglicol** PRS (Panreac).
- **Tetrahidrofurano** grado HPLC (Sigma-Aldrich).

- **n-Hexano** grado HPLC (Merck).
- **Éter de petróleo** PA (J. T. Baker).
- **Acetato de etilo** PRS (Riedel-de-Haën, Madrid, España).

3.- MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN

3.1 - Material de laboratorio

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizó el siguiente material:

- **Matraces aforados** clase A, de diferentes capacidades.
- **Pipetas graduadas** y aforadas clase A de diferentes capacidades.
- **Viales de vidrio** para inyección cromatográfica de 2.0 y 1.5 mL.
- **Tapones de rosca y de cápsula** para viales de inyección cromatográfica.
- **Tubos de centrifuga** de 100 mL de capacidad.
- **Encapsulador** para viales cromatográficos.
- **Descapsulador** para viales cromatográficos.

- **Micropipetas** de 0.5-10 μL , 10-50 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL y 1000-10000 μL .
- **Frascos de plástico** (polipropileno), con capacidad volumétrica de 80 mL.
- **Matraces kitasatos** para vacío de diferentes tamaños.
- **Membranas de filtración 0.45 μm 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.
- **Jeringas** de 2 y 10 mL.
- **Agujas** de 0.8x40 mm.
- **Filtros de jeringa** de celulosa regenerada de 0.20 μm .
- **Microreactores** de vidrio de 10 mL de capacidad.
- **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.
- **Soxhlets** de 200 y 250 mL de capacidad.
- **Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, pesasustancias, pipetas Pasteur**, así como otro tipo de material elemental de vidrio que podemos encontrar en cualquier laboratorio analítico.

La limpieza y mantenimiento de todo material empleado a lo largo del trabajo experimental se realizó con mezcla crómica o 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 μ L).
- Compartimento termostatzado 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 μ 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
- Detector de Diodos Array UV-Vis.

3.2.2 - Sonda Ultrasonica 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 enrosable de diámetro final de 3 mm.

3.2.3 - Equipo de Extracción y/o digestión con microondas (Mars-CEM) equipado con:

- Catorce cartuchos para llevar a cabo la extracción/digestión de manera simultánea.
- Sensor de temperatura.
- Sensor de presión.

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 2003-07 Copyright 1983-2007 Microsoft Corporation (2007).

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 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 unidades¹. En la **Tabla 2.3**, se representa los valores aceptables para cada uno de estos coeficientes en función de la naturaleza de los datos experimentales²:

¹ Eriksson L., Johansson E., Wikström C., *Mixture design-design generation, PLS analysis, and model usage*. Chemom. Intel. Lab. Syst. 43; 1-24, 1998

² 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

Tabla 2.3 - Guía general para evaluar los coeficientes R^2 y Q^2 .

Naturaleza de los datos	R^2	Q^2
Química	Aceptable: ≥ 0.80	Aceptable: ≥ 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 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 (*Lopez³ et al.*, 2002; *Perez⁴*, 2001; *Montgomery⁵*, 2002; *Box⁶ et*

³ 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

⁴ Pérez C., *Estadística práctica con Statgraphics*. Ed. Prentice Hall, p. 691, Madrid, España, 2001

⁵ Montgomery D.C., *Diseño y análisis de experimentos*. Ed. Limusa Wiley, p. 686, México, México, 2002

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 (Murphy⁷ et al., 2004; Soo⁸ et al., 2003; Elibol & Ozer⁹, 2002; Kiran¹⁰ et al., 2001; Lindgren¹¹ et al., 1996; Poon¹², 1995; Zaid¹³ et al., 2003).

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.

⁶ 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

⁷ 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

⁸ 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

⁹ Elibol M., Ozer D., *Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus**. Process Biochem. 38; 367-372, 2002

¹⁰ 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

¹¹ Lindgren A., Sjöström M., Wold S., *PLS modeling of detergency performance for some technical nonionic surfactants*. Chemom. Intel. Lab. Syst. 32; 11-124, 1996

¹² Poon G.K.K., *Sequential experimental study and optimisation of an acid cooper pattern plating process*. Circ. World 22; 7-13, 1995

¹³ 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

- 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:

⇒ **Etapa de calibración.** En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente (señal analítica) con la variable independiente (concentración).

$$\text{Señal analítica} = f(\text{concentración}) \quad (2.1)$$

⇒ **Etapa 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.

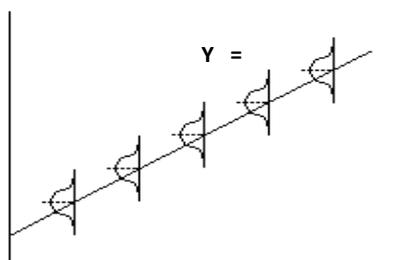


Figura 2.1- Ilustración gráfica del modelo de regresión lineal.

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*¹⁴. 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.

¹⁴ Dean R.B., Dixon W.J., *Simplified statistics for small numbers of observations*. Anal. Chem. 23; 636-638, 1951

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 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 α 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 α , 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 & Rius¹⁵, 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 (que son la diferencia entre los valores predichos y los experimentales) frente a la concentración.

¹⁵ 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

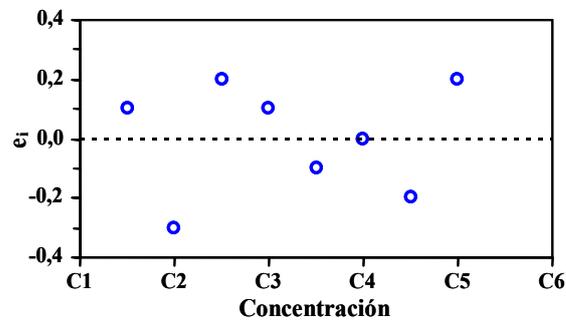


Figura 2.2 - Distribución de los residuales frente a la concentración (condición de homocedasticidad).

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 calibrado¹⁶. 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.

¹⁶ Analytical Methods Committee. *Is My Calibration Linear?* Analyst 119; 2363-2366, 1994

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 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 calibrado¹⁷.

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*¹⁸ proponen que la sensibilidad analítica 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.

¹⁷ IUPAC, *Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. Analytical chemistry division. Spectrochim. Acta B* 33; 241-245, 1978

¹⁸ Mandel J., Stiehler R.D., *Sensitivity - A criterion for the comparison of methods of test. J. Res. Natl. Bur. Std.* 53, 155-159, 1954

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 blanco¹⁷:

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:

$$X_Q = X_B + k \cdot S_B \quad (2.10)$$

Por tanto, y siguiendo un razonamiento similar al anterior, la concentración correspondiente a este límite de cuantificación vendrá dada por la siguiente expresión:

$$C_Q = \frac{k \cdot S_B}{b} \quad (2.11)$$

recomendándose en este caso el valor mínimo de 10 para la constante k .

b) Metodología basada en la recta de calibrado¹⁹:

Esta metodología se basa en una estimación por extrapolación de la recta 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:

¹⁹ 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

$$S_c = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.14)$$

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:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \text{D.E.R.}(b) \cdot d_o^2} \quad (2.16)$$

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:

$$X_L = 3 \cdot S_o \quad (2.18)$$

$$X_Q = 10 \cdot S_o \quad (2.19)$$

c) Metodología basada en la relación señal/ruido:

La base de la metodología en función de la relación señal/ruido fue introducida por Kaiser²⁰ en 1970, y desarrollada posteriormente en los años ochenta por Sharif²¹ 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 calcula una media de la señal con su correspondiente desviación estándar. Por último, se hace la media de estos resultados y se

²⁰ Kaiser, H., *Report for analytical chemists. II. Quantitation in elemental analysis*. Anal. Chem. 42; 26-59, 1970

²¹ Sharaf M.A., Illman D.L., Kowalski B.R., *Chemometrics*, Ed. Wiley, New York, USA, 1986

halla 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”²²:

Esta metodología ha sido desarrollada por Vilchez y colaboradores. Según 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^{23,24}, uso del término independiente de la ecuación de calibrado²⁵, cálculo de propagación de errores²⁶ o estimación aproximada por extrapolación de la recta de calibrado¹⁹. Métodos que presentan numerosos problemas de tipo práctico y determinan una gran arbitrariedad en la estimación del límite de detección en cromatografía.

²² 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

²³ Snyder L.R., *Practical HPLC methods development*, Ed. Wiley, Chichester, UK, 1988

²⁴ 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

²⁵ Miller J.M., *Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review*. Analyst 116; 3-149, 1991

²⁶ Long G.L., Winefordner, J.D., *Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition*. Anal. Chem. 55; 712-724, 1983

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 Gaussiano²⁷.

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 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.

²⁷ Klinkenberg A., Sjenitzer F., *Holdng-time distributions of the gaussian type*. Chem. Engin. Sci. 5; 258-270, 1956

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.

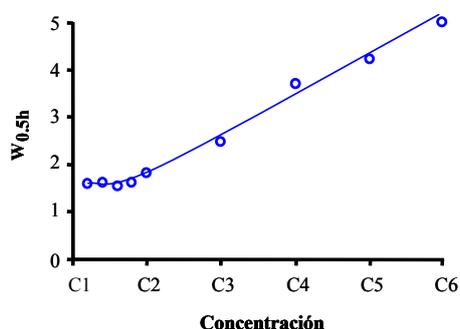


Figura 2.4 - Variación de la anchura de pico con la concentración.

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 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 Cuadros²⁹ 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:

$$\text{Rec}(\%) = \frac{C_{\text{muestra fortificada}} - C_{\text{muestra no fortificada}}}{C_{\text{adicionada}}} \cdot 100 \quad (2.23)$$

²⁹ 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

7.2 - Metodología de adición de patrón

Esta metodología propuesta por Cuadros²⁹ 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 $S_1^2 = S_2^2 \quad F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow$ hipótesis nula (H_0)

Varianzas distintas $S_1^2 \neq S_2^2 \quad F_{cal} \geq F_{tab} \Rightarrow$ 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:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\mathbf{b}_1 - \mathbf{b}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{\sum (\mathbf{c}_1 - \bar{\mathbf{c}}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum (\mathbf{c}_2 - \bar{\mathbf{c}}_2)^2}}} \quad (2.25)$$

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:

$$f = \frac{\frac{S_1^2}{\sum (\mathbf{c}_1 - \bar{\mathbf{c}}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum (\mathbf{c}_2 - \bar{\mathbf{c}}_2)^2}}{\frac{S_1^2 / \sum (\mathbf{c}_1 - \bar{\mathbf{c}}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{S_2^2 / \sum (\mathbf{c}_2 - \bar{\mathbf{c}}_2)^2}{n_2 - 2}} \quad (2.26)$$

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} :

$$\mathbf{a}_{CY} \in \mathbf{a}'_{CP} \pm \mathbf{t}_\alpha \mathbf{S}_p \sqrt{\frac{\sum \mathbf{c}_{i,CP}^2}{\mathbf{n} \sum (\mathbf{c}_{i,CP} - \bar{\mathbf{c}})^2}} \quad (2.31)$$

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:

$$t(\mathbf{c}) = \frac{|\mathbf{c}_{x,1} - \mathbf{c}_{x,2}|}{\frac{S_P}{b_P} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} - \frac{(y_1 - y_2)^2}{b_P^2 [\sum (\mathbf{c}_{i,1} - \mathbf{c}_1)^2 + (\mathbf{c}_{i,2} - \mathbf{c}_2)^2]}}} \quad (2.33)$$



CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES



1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se presenta la optimización de las variables tanto químicas como físicas de las diferentes metodologías propuestas para la determinación de tensioactivos aniónicos (*LAS* y jabón) en matrices ambientales.

En el primer apartado, se desarrolla la puesta a punto de las metodologías para el jabón. Con objeto de su determinación, se propone, en la primera parte, la síntesis de diferentes patrones del jabón (cálcico, potásico y el procedente del ácido graso de coco). La carencia, por parte del analito (jabón), de propiedad física lo suficientemente sensible para llevar a cabo su análisis en matrices ambientales, hizo necesaria la puesta a punto de una o varias reacciones de derivación. Previa optimización, en la segunda parte, de los parámetros instrumentales propios de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, entre los que se incluye la separación cromatográfica de cada uno de los compuestos objeto de estudio, se proponen, en la tercera y cuarta parte, dos diferentes reacciones

de derivación para el jabón. Las variables de cada reacción propuesta son optimizadas mediante la aplicación de un diseño experimental. Cabe resaltar, que cada reacción es específica para cada tipo de detección empleado, presentándose una derivación para la detección fluorescente y otra para la detección ultravioleta.

Por otro lado, se desarrolla, en el segundo apartado, la optimización de las variables para la determinación del LAS. El hecho de ser un tensioactivo con fluorescencia nativa simplificó la propuesta metodológica de manera significativa, en la cual se optimizaron los parámetros cromatográficos de acuerdo a las exigencias analíticas de la presente Memoria. Estas exigencias fueron, sobre todo, resolver de manera aceptable los isómeros del LAS, fundamentalmente, el 2Ø de cada homólogo.

2.- DETERMINACIÓN DE JABÓN POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES

2.1 - Síntesis del jabón

2.1.1 - Patrones individuales

Para la determinación del jabón y su posterior estudio ambiental, se requirió la síntesis de dos especies de jabón: el jabón cálcico y el jabón potásico. La metodología se basó en la presentada por *Moreno*¹, la cual comprende varios pasos para cada especie de jabón:

¹ Moreno A., Bravo J., Ferrer J., Bengoechea C. *Soap determination in sewage sludge by HPLC*. SETAC Europe meeting. Postdam, 1992.

Síntesis del jabón potásico:

- Se partió de patrones de pureza conocida para cada ácido graso con longitud de cadena comprendida entre C₈ y C₁₈.
- Se disolvió una cantidad conocida del ácido graso (por lo general 10 g) en 100 mL de acetona.
- Se preparó una disolución saturada de K₂CO₃ en 15 mL de agua.
- Se mezclaron ambas disoluciones, lo que dio lugar a un precipitado blanco, proveniente de la insolubilidad en acetona del jabón potásico generado.
- Se filtró la suspensión generada en un sistema de filtrado formado por un quitasato, un Büchner y un papel de filtro de celulosa.
- Se lavó el precipitado varias veces con acetona para eliminar los posibles restos de ácido graso que pudieran quedar.
- Con objeto de precipitar los posibles restos de ácidos que pudieran quedar, se añadió disolución saturada de K₂CO₃ a las aguas de filtrado, esta disolución se volvió a filtrar y a lavar.
- Se combinaron ambos precipitados y se dejaron secar a temperatura ambiente durante un día.
- Se calculó su rendimiento mol a mol.
- Se repitió este protocolo para cada uno de los ácidos grasos.

Tabla 3.1- Rendimientos de la síntesis de jabón potásico.

JABÓN POTÁSICO	RENDIMIENTO (%)
C ₈	98.7
C ₁₀	99.1
C ₁₂	97.7
C ₁₃	99.3
C ₁₄	98.4
C ₁₆	99.1
C ₁₇	97.1
C ₁₈	97.9
C _{18:1}	99.3
C _{18:2}	99.7

Síntesis del jabón cálcico:

- Se partió del jabón potásico obtenido en la etapa anterior.
- Se disolvió una cantidad conocida del jabón potásico en la cantidad mínima posible de agua caliente.
- Se prepararon 15 mL de disolución saturada de CaCl₂ en agua caliente.
- Se mezclaron ambas disoluciones, lo que dio lugar a un precipitado blanco instantáneo, proveniente de la insolubilidad en agua del jabón cálcico generado.
- Se filtró la suspensión generada en un sistema de filtrado formado por un quitasato, un Büchner y un papel de filtro de celulosa.
- Se lavó el precipitado varias veces con agua caliente para eliminar los posibles restos de jabón potásico y de cloruro cálcico que pudieran quedar.

- Con objeto de precipitar los posibles restos de jabón potásico que pudieran quedar, se añadió disolución saturada en agua caliente de CaCl_2 a las aguas de filtrado, esta disolución se volvió a filtrar y a lavar.
- Se combinaron ambos precipitados y se secaron en una estufa a 60 grados durante varios días hasta pesada constante.
- Se calculó su rendimiento mol a mol.
- Se repitió este protocolo para cada uno de los jabones potásicos. Cabe resaltar, que debido a la insolubilidad en agua del jabón potásico de cadena más larga (C_{16} y C_{18}), se calentó las disoluciones a una temperatura mayor.

Tabla 3.2- Rendimientos de la síntesis del jabón cálcico.

JABÓN CÁLCICO	RENDIMIENTO (%)
C_8	96.5
C_{10}	97.6
C_{12}	96.4
C_{13}	96.1
C_{14}	97.3
C_{16}	97.1
C_{17}	97.4
C_{18}	94.6
$\text{C}_{18:1}$	97.3
$\text{C}_{18:2}$	98.7

2.1.2 - Patrón de jabón proveniente del ácido graso de coco

Para llevar a cabo el ensayo de campo, se utilizó como analito objeto de estudio jabón sódico de coco, el cual proviene del ácido graso de coco. La razón que justifica la elección de este tipo de jabón radica en su amplia utilización en detergentes comerciales, siendo de esta manera el jabón más utilizado, y por tanto el de mayor interés desde el punto de vista medioambiental. Otra característica, también relacionada con la anterior, es su relativa buena solubilidad, sobre todo si se compara con el jabón de grasas de origen animal. Este hecho, es debido a su mayor proporción de jabón de cadena más corta (C₁₂-C₁₄), llegando a tener concentraciones próximas al 50% en C₁₂.

La composición del ácido graso de partida se determinó mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas previa derivación con metanol y BF₃².

Para la determinación de la composición, se estableció, mediante relación de áreas (A patrón/ A patrón interno), un calibrado a un solo nivel (100 mg·L⁻¹).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.3**.

² González Casado A. *Determinación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1996.

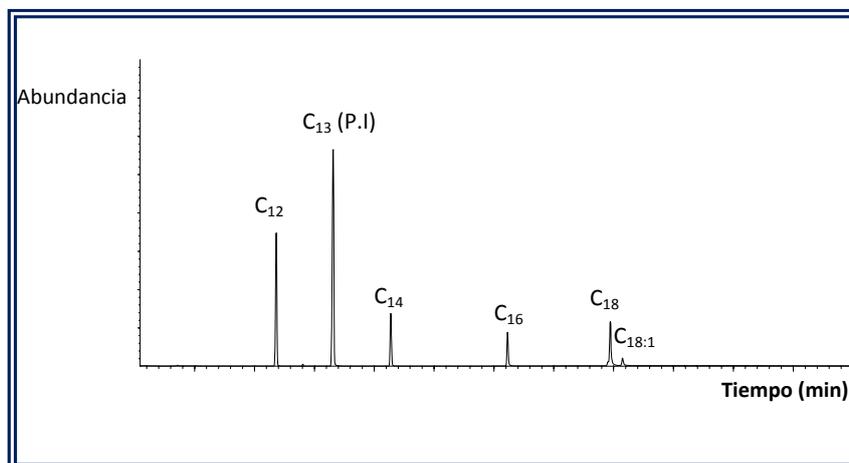


Figura 3.1- Cromatograma obtenido de los esteres del ácido graso de coco. Modo Scan.

Tabla 3.3- Composición del ácido graso de coco por GC-MS.

ÁCIDOS GRASOS (ESTERIFICADOS)	COMPOSICIÓN (%)
C ₁₂	51.6
C ₁₃	Patrón interno
C ₁₄	16.4
C ₁₆	10.6
C _{18:1}	18.3
C ₁₈	3.1
Total	100

La síntesis del jabón de coco se realizó de la misma manera que para los ácidos grasos individuales descritos en el apartado anterior. Cabe destacar, que como consecuencia de la gran cantidad de muestra tratada (800 g de ácido graso) y al volumen de agua utilizado (1 L), el período de secado se alargó de manera notable en comparación con los ácidos grasos

individuales (1 día de secado), llegando a durar varias semanas hasta conseguir un sólido seco de alta pureza. El rendimiento se calculó de la misma manera que en apartado anterior, obteniéndose un valor del 95%. Finalmente, se analizó el sólido obtenido mediante cromatografía líquida¹ para comprobar si durante el proceso de síntesis se había producido alguna alteración en la proporción de partida.

Tabla 3.4- Composición del ácido graso de coco por HPLC.

ÁCIDOS GRASOS	COMPOSICIÓN (%)
C ₁₂	51.2
C ₁₃	Patrón interno
C ₁₄	16.6
C ₁₆	10.8
C _{18:1}	18.5
C ₁₈	2.9
Total	100

A la vista de los resultados obtenidos, no existe una variación apreciable en la composición. Las pequeñas oscilaciones puede achacarse más a la diferencia de los métodos analíticos utilizados (para el ácido graso cromatografía de gases, para el jabón cromatografía de líquidos) que a algún tipo de incidente derivado del proceso de síntesis.

Una vez sintetizado, y después de su análisis, el sólido se conservó en un recipiente de plástico en el frigorífico a 4 °C.

2.2 - Optimización de las variables implicadas en el proceso cromatográfico

Para la optimización de las variables cromatográficas se partió de las condiciones para la reacción de derivación del jabón encontradas en bibliografía con algunas modificaciones^{1,3}.

Protocolo de derivación:

1. Se disolvió una mezcla de jabón potásico (C₈K- C₁₈K) en metanol (5 mg·L⁻¹).
2. Se pipeteó una cantidad de la disolución metanólica (3 mL). Se evaporó hasta sequedad.
3. Se añadió 1.5 mL de disolución de 4-Bromometil-7-metoxicumarina (BrMMC) al 0.5% en acetona y 1.5 mL de disolución de 18-éter-6-corona al 0.1% en acetona.
4. Se calentó a 80 °C durante 30 minutos.
5. Se inyectó en el cromatógrafo de líquidos.

Se partió del siguiente método cromatográfico:

³ Hayashi K., Kawase J., Yoshimura K., Ara K. *Determination of trace of levels fatty metal salts by HPLC with fluorescense prelabeling*. Analytical Biochemistry 136; 314-320, 1984.

Tabla 3.5- Variables cromatográficas iniciales.

PARÁMETROS INICIALES	
Vol. Inyección	50 μ L
Flujo	1.5 mL \cdot min ⁻¹
Temperatura	30 °C
Detección	$\lambda_{ex.}$ = 325 nm $\lambda_{em.}$ = 398 nm
Eluyentes	Canal A = Agua HPLC Canal B = ACN HPLC
Gradiente	T ₀ = 70%B T ₁₀ = 80%B T ₁₅ = 85%B T ₂₀ = 85%B T ₂₅ = 100%B
Ganancia	12 eV

A partir de dicho método, se fueron optimizando cada una de las variables. Para la optimización se usó un patrón de jabón potásico de 5 mg \cdot L⁻¹ (C₈K-C₁₈K).

2.2.1 - Selección de la fase estacionaria

Con objeto de optimizar la separación cromatográfica del jabón, se estudiaron 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*, aunque también pueden poseer algunos grupos funcionales polares enlazados sobre la de sílice como: *ciano*, *diol*, y *amino*. Normalmente, la fase amino (-NH₂) 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 -NH₂. No se obtuvieron buenos resultados con esta columna. Por lo tanto, se desechó la cromatografía en fase normal.

Para la modalidad reversa, 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 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 (C8, C18...), 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 silícea ha sido enlazada a cadenas alquílicas largas, normalmente cadenas de 18 carbonos (C₁₈).

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones previas, se comentan a continuación las columnas ensayadas:

- Lichrospher RP-8 250 mm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
- Lichrospher RP-8 125 mm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
- Lichrospher RP-18 125 mm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
- Lichrospher RP-18 250 mm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).

Se ensayaron diferentes gradientes para las distintas columnas, para evaluar en cuál de todas ellas se obtenían mejor resolución cromatográfica. Los resultados obtenidos se muestran a continuación junto con los cromatogramas correspondientes.

- Lichrospher RP-8 250 mm x 4.6 mm.

Tabla 3.6- Gradientes RP-8 250 mm x 4.6 mm.

	t (min)				
	0	10	15	20	25
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%
Gradiente 2	60%	70%	75%	75%	90%
Gradiente 3	65%	75%	80%	80%	95%
Gradiente 4	75%	85%	90%	90%	100%

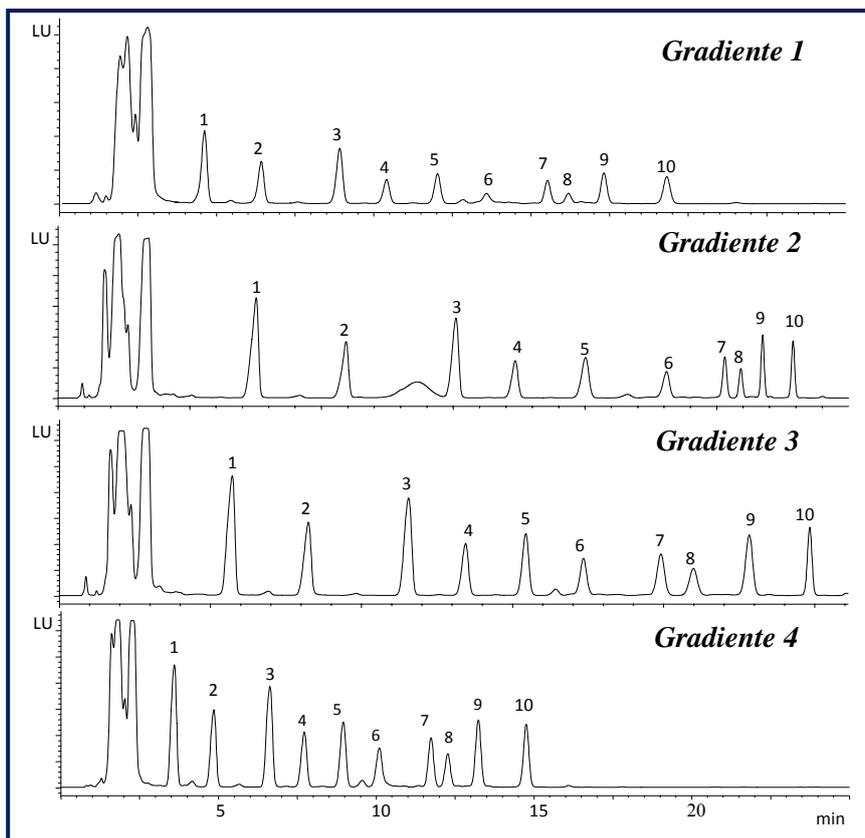


Figura 3.2- Lichrospher RP-8 250 mm x 4.6 mm. Por orden de elución: $C_8K(1)$, $C_{10}K(2)$, $C_{12}K(3)$, $C_{13}K(4)$, $C_{14}K(5)$, $C_{18:2}K(6)$, $C_{16}K(7)$, $C_{18:1}K(8)$, $C_{17}K(9)$, $C_{18}K(10)$.

- Lichrospher RP-8 125 mm x 4.6 mm.

Tabla 3.7- Gradientes RP-8 125 mm x 4.6 mm.

	t (min)					
	0	10	15	20	25	30
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%	-
Gradiente 2	50%	-	-	65%	85%	100%
Gradiente 3	65%	-	70%	85%	100%	-
Gradiente 4	65%	-	80%	90%	100%	-

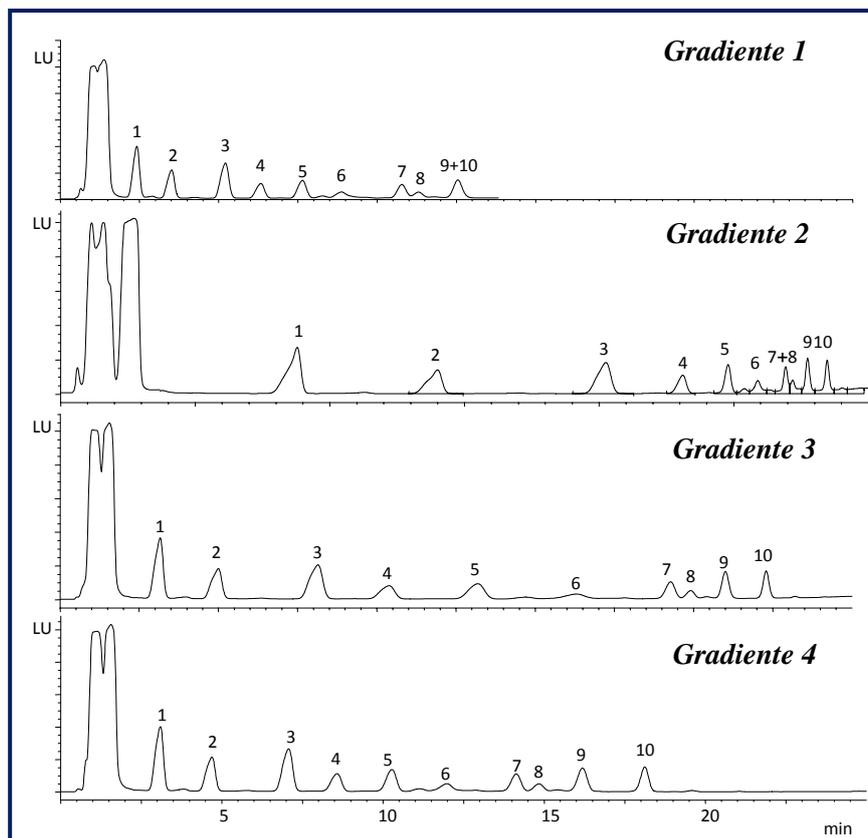


Figura 3.3- Lichrospher RP-8 125 mm x 4.6 mm. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

- Lichrospher RP-18 125 mm x 4.6 mm.

Tabla 3.8- Gradientes RP-18 125 mm x 4.6 mm.

	t (min)					
	0	10	15	20	25	30
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%	-
Gradiente 2	75%	80%	-	100%	-	-
Gradiente 3	65%	-	75%	80%	-	100%

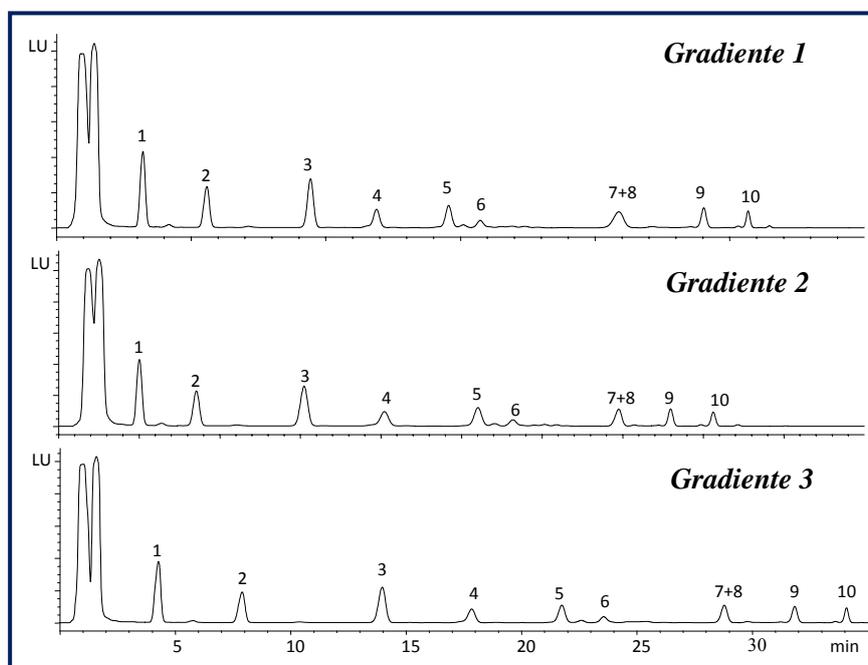


Figura 3.4- Lichrospher RP-18 125 mm x 4.6 mm. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

- Lichrospher RP-18 250 mm x 4.6 mm.

Tabla 3.8- Gradientes RP-18 250 mm x 4.6 mm.

	t (min)					
	0	10	15	20	25	30
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%	-
Gradiente 2	80%	-	85%	85%	-	100%
Gradiente 3	85%	-	85%	85%	-	95%
Gradiente 4	60%	-	-	-	100%	-

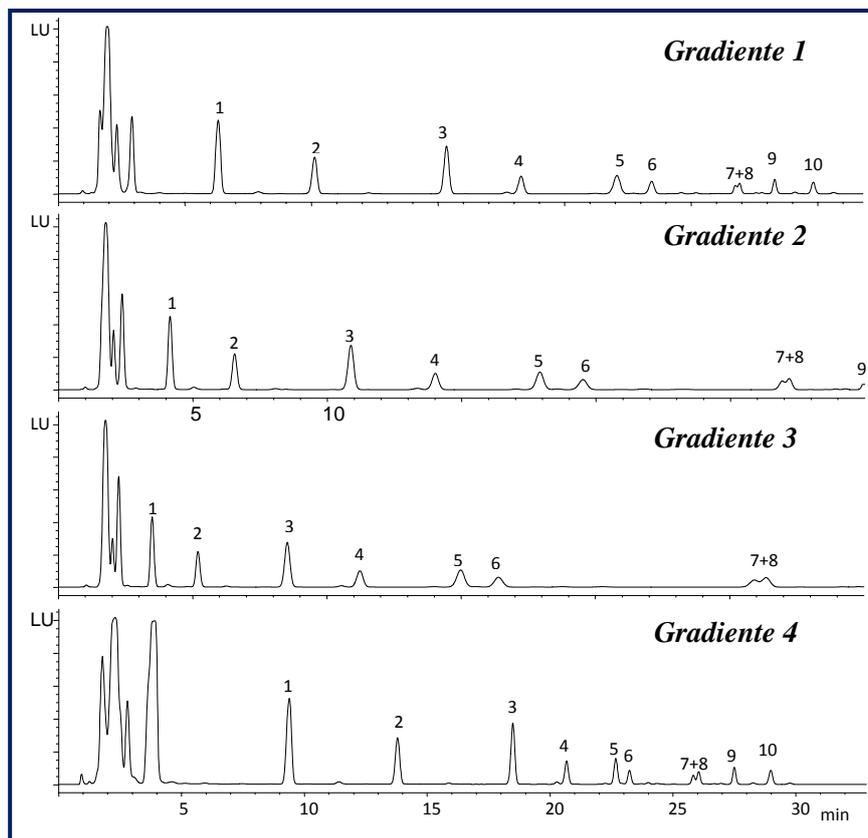


Figura 3.5- Lichrospher RP-18 250 mm x 4.6 mm. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

➤ Discusión

De las cuatro columnas estudiadas, la columna Lichrospher RP-8 250 mm x 4.6 mm es la que presentó una mejor relación entre separación, tiempo de análisis y resolución de los analitos presentes, por lo que, se seleccionó como columna de trabajo. La columna RP-8 de 125 mm, aunque mostraba buena separación para todos los analitos, tenía el inconveniente de la menor resolución, debido a la mayor anchura de los picos. Del mismo modo, se desecharon las columnas RP-18, ya que a pesar de que los picos poseían buenas características, la fase estacionaria fue incapaz de separar las sales de los ácidos grasos C₁₆ del C_{18:1}.

2.2.2 - Optimización del gradiente y del flujo

Una vez seleccionado el tipo de columna, el siguiente paso fue la optimización conjunta del gradiente y del flujo, con objeto de buscar un compromiso entre el gasto de eluyente, la sensibilidad y la resolución. 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 proporcional la composición de la fase móvil, o en modo *gradiente*. Debido a la complejidad de la mezcla de jabón y al gran número de analitos analizados, el método isocrático no fue adecuado para resolver todos los picos. Por lo tanto, se procedió a llevar a cabo una elución en gradiente, partiendo de las condiciones descritas en la **Tabla 3.6, gradiente 1**. Las condiciones de partida fueron: *Gradiente: T₀ = 70% B T₁₀ = 80% B T₁₅ = 85%B T₂₀ = 85% B T₂₅ = 100% B*. Los demás parámetros se mantuvieron constantes.

Tabla 3.9- Gradientes para flujo 1 mL·min⁻¹.

	t (min)				
	0	10	15	20	25
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%
Gradiente 2	80%	90%	95%	95%	100%
Gradiente 3	75%	85%	90%	90%	95%

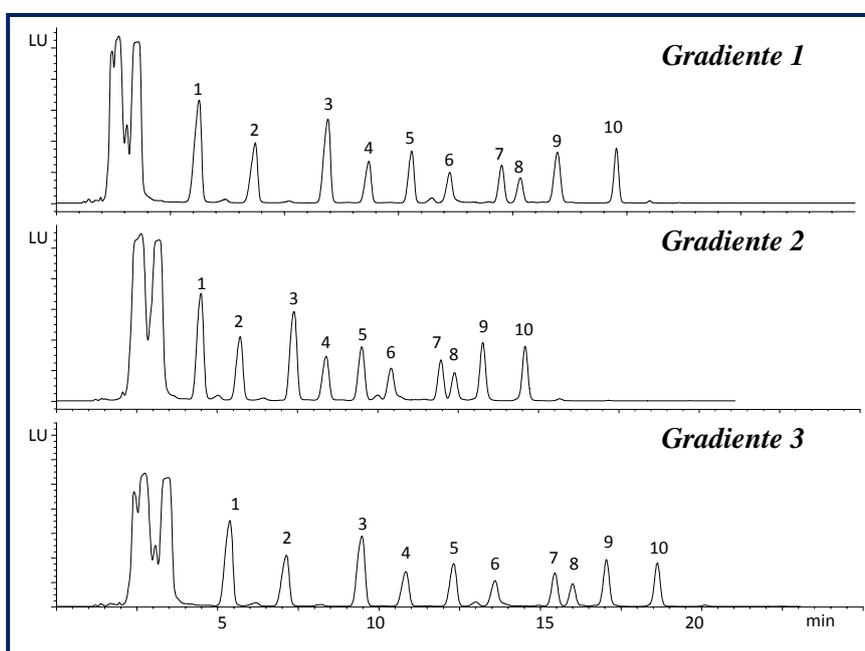


Figura 3.6- Flujo 1 mL·min⁻¹. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

Tabla 3.10- Gradientes para flujo 1.5 mL·min⁻¹.

	t (min)				
	0	10	15	20	25
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%
Gradiente 2	60%	70%	75%	75%	90%
Gradiente 3	65%	75%	80%	80%	95%
Gradiente 4	75%	85%	90%	90%	100%

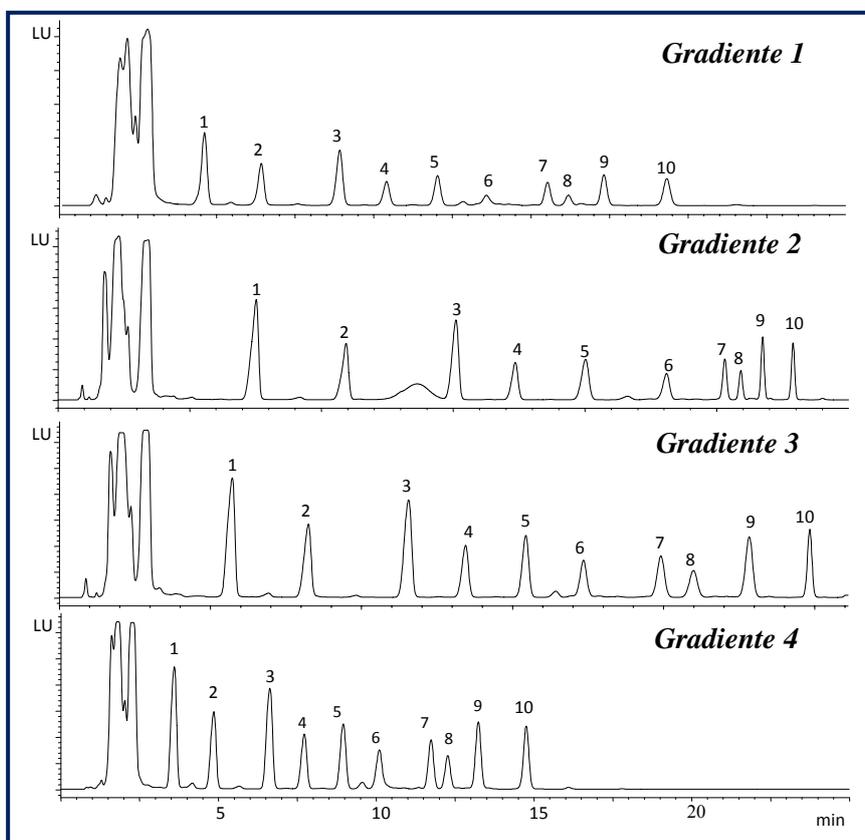


Figura 3.7- Flujo 1.5 mL·min⁻¹. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

Tabla 3.11- Gradientes para flujo 2 mL·min⁻¹.

	t (min)				
	0	10	15	20	25
Gradiente 1	70%	80%	85%	85%	100%
Gradiente 2	65%	75%	80%	80%	100%
Gradiente 3	75%	85%	90%	90%	100%

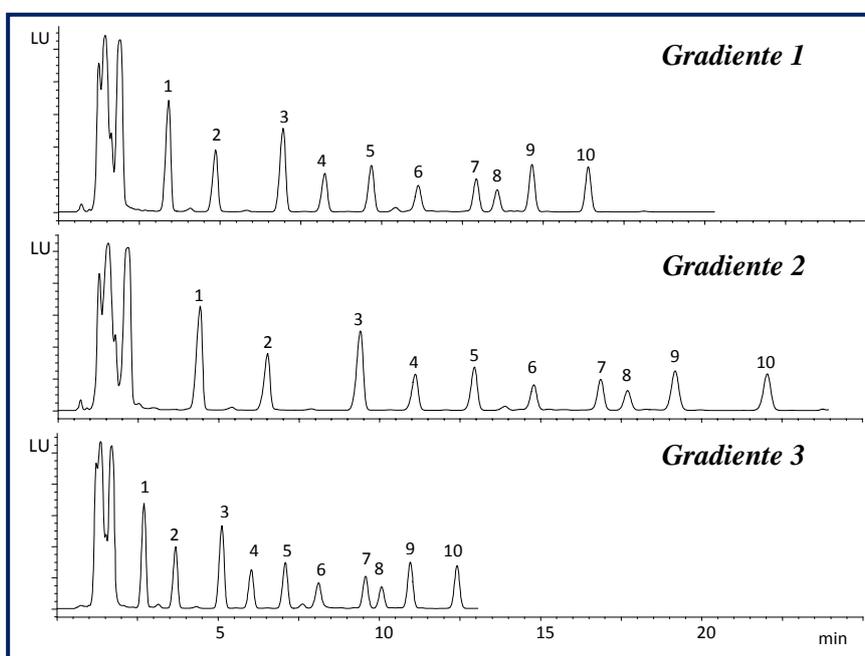


Figura 3.8- Flujo 2 mL·min⁻¹. La nomenclatura de los picos es la misma que para la figura 3.2.

➤ Discusión

Después de haber ensayado varios gradientes a diferentes flujos, se concluyó como solución de compromiso la elección del siguiente flujo y

gradiente de trabajo: *Gradiente: $T_0 = 70\%B$ $T_{10} = 80\%B$ $T_{15} = 85\%B$ $T_{20} = 85\%B$ $T_{25} = 100\%B$ Flujo: $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figura 3.2, gradiente I)*. La selección de estas condiciones se basó en que, aunque a flujos más altos se obtenían menores tiempos de elución, la mejora que esto mostraba no era tan significativa si lo comparamos con el gasto de eluyente que suponía trabajar a flujo de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, con el consiguiente descenso de la sensibilidad. Además, una disminución del flujo a $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ daba como resultado una disminución de los tiempos de retención, pero una peor separación entre el jabón C_{16} y $C_{18:1}$. En cuanto al gradiente, para un flujo seleccionado de $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, un aumento en la cantidad de fase orgánica (acetonitrilo) superior al seleccionado provocaba una disminución de los tiempos de retención, junto con una disminución en la resolución de los analitos, especialmente, entre el jabón C_{16} y $C_{18:1}$. Del mismo modo, un excesivo aumento del porcentaje del eluyente polar (agua) generaba tiempos mayores, alargando el cromatograma de manera innecesaria.

2.2.3 - Composición de la fase móvil

El estudio de la fase móvil es crucial, debido a que puede afectar de manera notable a la separación cromatográfica. A continuación, se presentan los ensayos realizados sobre la fase móvil.

- Influencia del metanol

Inicialmente, se eligieron como eluyentes de cromatografía agua y acetonitrilo, por ser los más usuales para cromatografía reserva. A pesar de que la resolución, usando estos dos eluyentes, fue aceptable, se propuso ensayar otro tipo de disolventes como fase móvil, ya que a parte del acetonitrilo, tanto el metanol como el tetrahidrofurano son habitualmente

usados como complementos al agua en cromatografía reversa. El tetrahidrofurano mostraba el inconveniente de que provocaba inestabilidad y aumento en la presión en columna, por lo que quedó el metanol como única alternativa. Para comprobar su comportamiento, se prepararon varias mezclas de disolventes. Las fases móviles compuestas por canal A: metanol, canal B: acetonitrilo y la formada por canal A: agua y canal B: metanol dieron resultados poco satisfactorios, debido a que, en el caso uno, se obtenía una fase móvil excesivamente poco polar, provocando poca separación entre los picos; y en el caso dos, por el contrario, la composición era muy polar, con lo que se alargaba los tiempos de retención más de lo deseable. Por lo tanto, para comprobar su posible efecto en la separación, la única posibilidad que quedó fue ir añadiendo al agua cantidades crecientes de metanol.

Tabla 3.12- Porcentajes ensayados de metanol.

ENSAYOS	PORCENTAJE METANOL
Porcentaje 1	10%
Porcentaje 2	20%
Porcentaje 3	30%
Porcentaje 4	50%
Porcentaje 5	70%
Porcentaje 6	100%

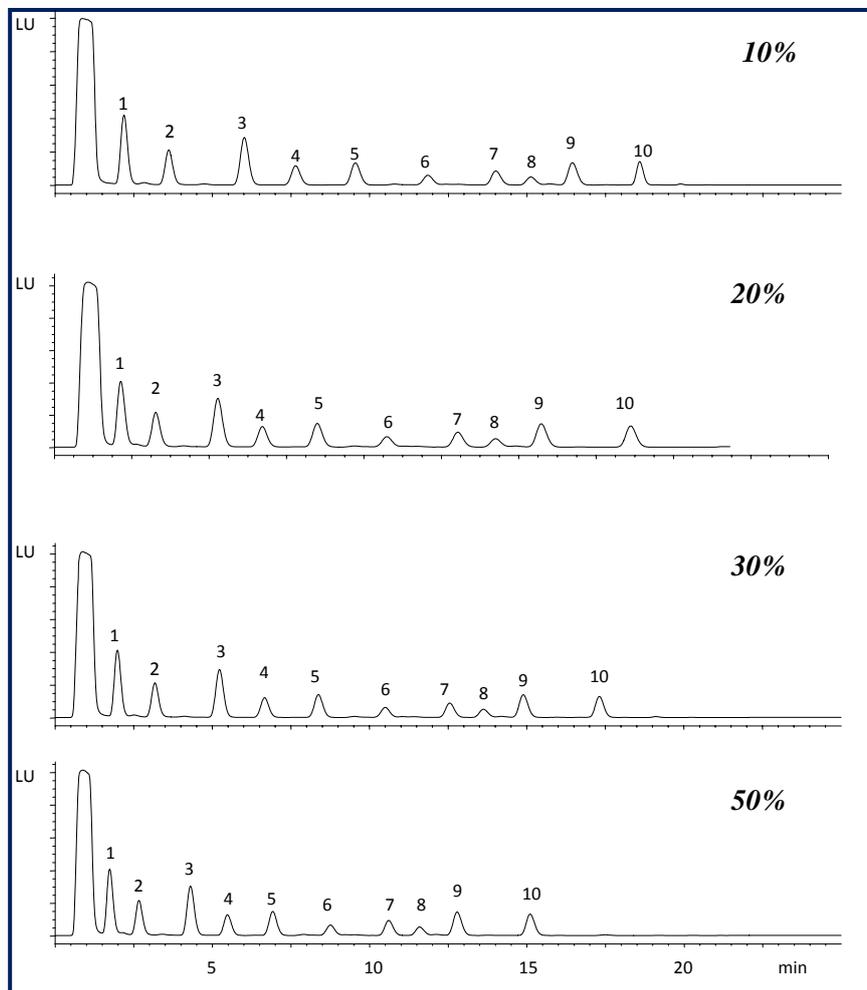


Figura 3.9-Variación en la proporción de metanol. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

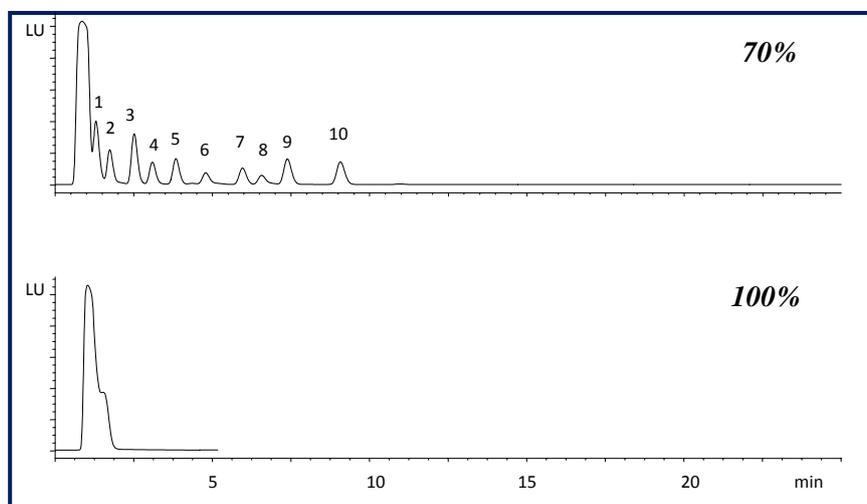


Figura 3.9-Variación en la proporción de metanol. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2. (cont.).

➤ Discusión

La adición de metanol en la fase móvil canal A (agua) provocó varios efectos: una bajada de la presión proporcional a la cantidad de metanol que se añadió, un acortamiento en el tiempo de análisis cromatográfico, y una disminución de la resolución y separación cromatográfica, es decir, con una mayor cantidad de metanol se obtuvo una menor presión de trabajo, un menor tiempo de análisis y una peor separación. Por lo tanto, la composición óptima de la fase móvil fue la inicialmente propuesta: Canal A: Agua HPLC, Canal B: ACN HPLC.

• Influencia del pH

La tolerancia de las columnas en fase reversa está comprendida entre valores de pH de 2.5 y 8. Si se trabaja a valores por encima o por debajo

de este rango, puede provocar una disminución en la vida de las mismas. La modificación del pH tiene mucha importancia en cromatografía reversa, ya que la carga de los grupos silanoles enlazados en la fase estacionaria depende en gran medida de la concentración de iones hidronio del medio, pudiendo en muchos casos modificar la separación cromatográfica de manera sustancial.

En este estudio se ensayaron varios tipos de ácidos y disoluciones reguladoras. Los ácidos utilizados fueron el ácido trifluoroacético y el ácido fórmico, los cuales fueron añadidos a la fase acuosa en una concentración del 0.1% v/v, generando un pH de 2.5. A continuación se prepararon disoluciones reguladoras a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 7, 8), usando para ello K_2HPO_4 (10 mM) anhidro y H_3PO_3 . Las condiciones de trabajo, exceptuando la fase móvil, fueron las iniciales. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 3.13- Rango de pH ensayado.

ENSAYOS	pH
Ac. fórmico	2.4
TFA	2.5
Reguladora 1	4
Reguladora 2	5
Reguladora 3	7
Reguladora 4	8

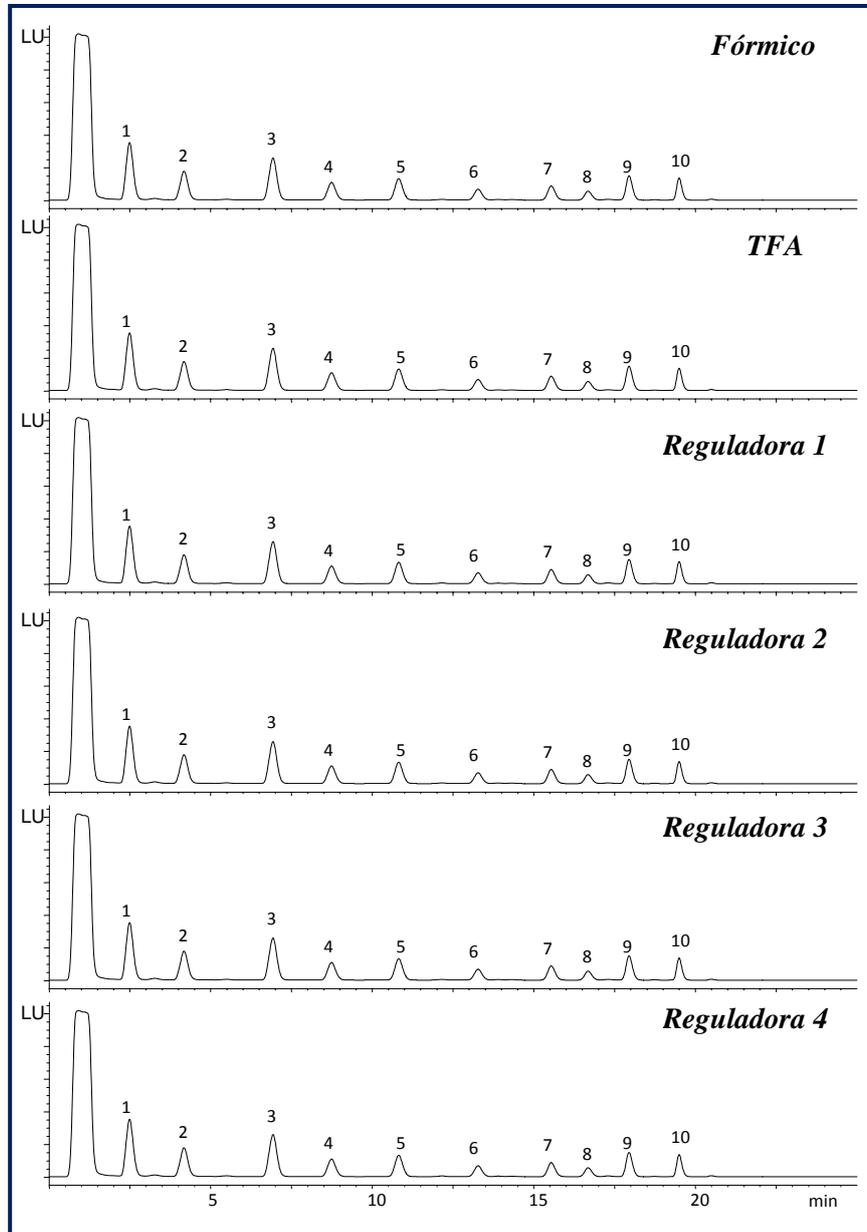


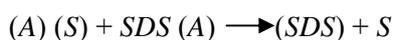
Figura 3.10- Ensayos a diferente pH. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

➤ Discusión

A la vista de los cromatogramas obtenidos, se dedujo que no existía mejora en los parámetros cromatográficos a medida que iba variando el pH de la fase móvil. Además, se observó como la línea de presión durante el transcurso del cromatograma no se mantenía estable, por lo tanto, no fue necesario controlar el pH de la fase móvil.

• Influencia del agente micelar (SDS)

Según se recoge en bibliografía⁴, este tensioactivo 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. Sin embargo, si se producen interacciones entre *SDS* y moléculas de analito 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 y *S* es el disolvente. En nuestro caso, se prepararon cinco disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de *SDS*.

⁴ Heinig K., Vogt C., Werner G. *Determination of LAS in industrial and environmental samples by CE*. Analyst 123; 349-353, 1998.

Tabla 3.14- Concentraciones de SDS ensayadas.

ENSAYOS	CONCENTRACIÓN (mg·L ⁻¹)
SDS 1	500
SDS 2	750
SDS 3	1500
SDS 4	2000
SDS 5	5000

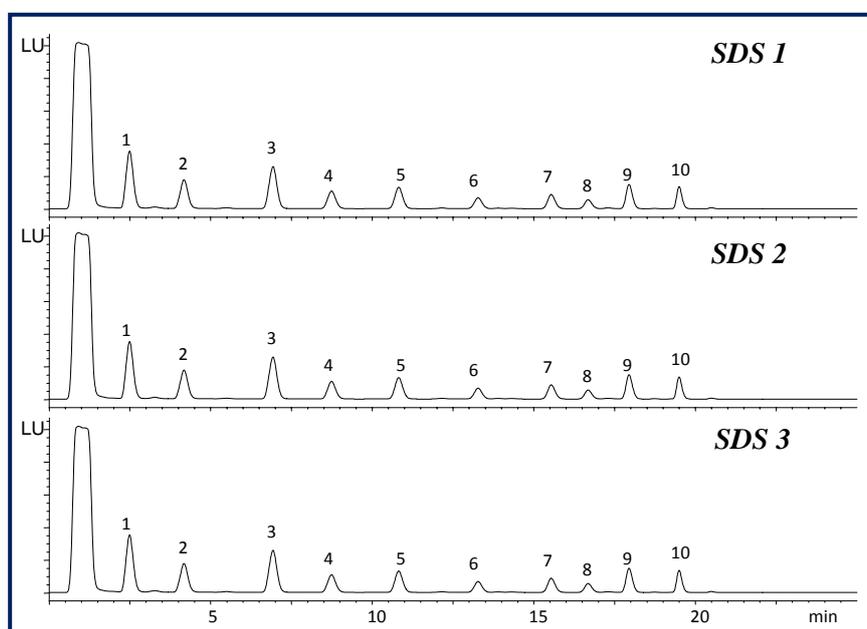


Figura 3.11- Ensayos a diferentes concentraciones de SDS. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

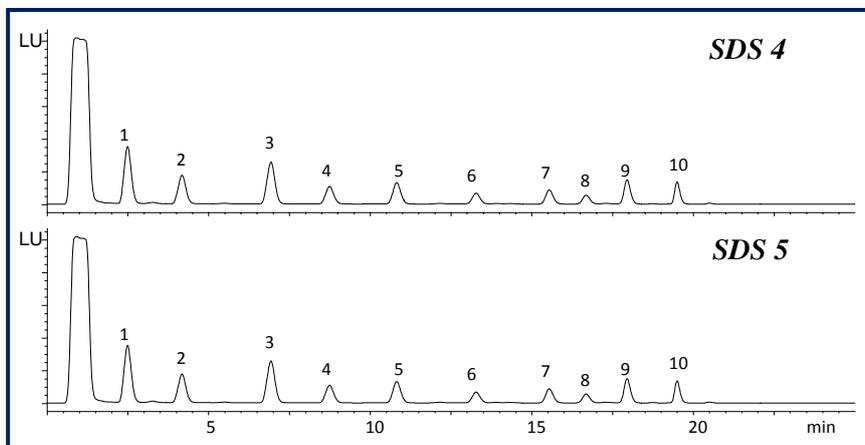


Figura 3.11- Ensayos a diferentes concentraciones de SDS. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2 (cont.).

➤ Discusión

La adición de un agente micelar no alteró ni la resolución ni la separación cromatográficas. Por lo tanto, no fue necesaria su utilización, ya que no aporta ninguna ventaja.

2.2.4 - Temperatura de la columna y la ganancia del fotomultiplicador

• Influencia de la temperatura

La temperatura de columna debe ser controlada para obtener 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 la eficiencia de la separación, pero a su vez 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 el caso de estudio se probaron tres temperaturas diferentes.

Tabla 3.15-Temperaturas ensayadas.

ENSAYOS	TEMPERATURA (°C)
Temperatura 1	20
Temperatura 2	30
Temperatura 3	40

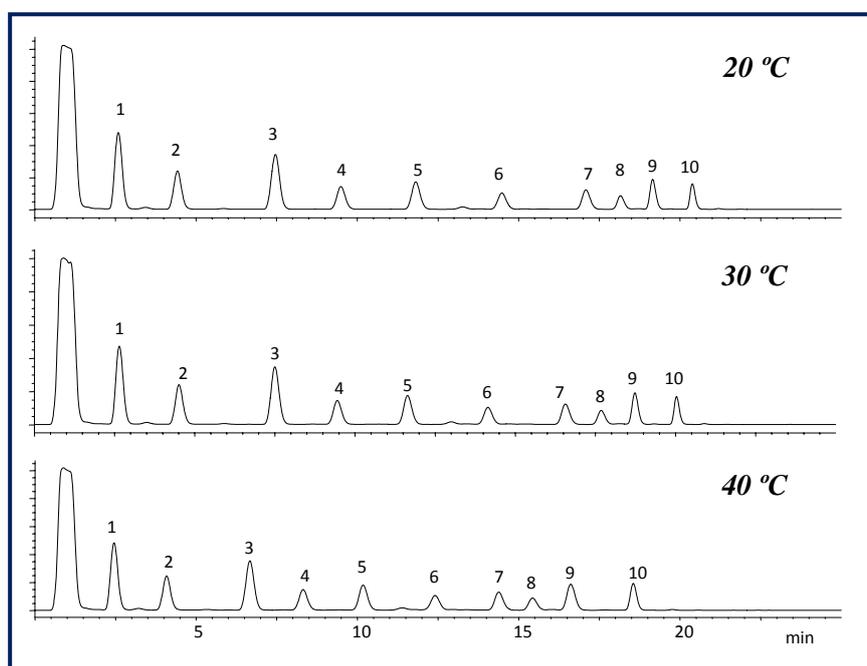


Figura 3.12- Ensayos a diferentes temperaturas. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

➤ Discusión

A medida que se aumentó la temperatura, disminuyeron los tiempos de retención, pero a su vez, se perdió resolución. Por lo tanto, se seleccionó la temperatura intermedia de 30 °C como solución de compromiso.

- Influencia de la ganancia del fotomultiplicador

La ganancia del fotomultiplicador en fluorescencia se mide en electrones voltios (eV), cuanto mayor es la cantidad de electrones voltios utilizada mayor es la señal, la cual está directamente relacionada con la sensibilidad. Sin embargo, un excesivo aumento de la ganancia puede generar en un tiempo menor de vida del detector. En nuestro caso, se estudiaron tres diferentes ganancias.

Tabla 3.16- Ganancias ensayadas.

ENSAYOS	GANANCIA (eV)
Ganancia 1	10
Ganancia 2	12
Ganancia 3	14

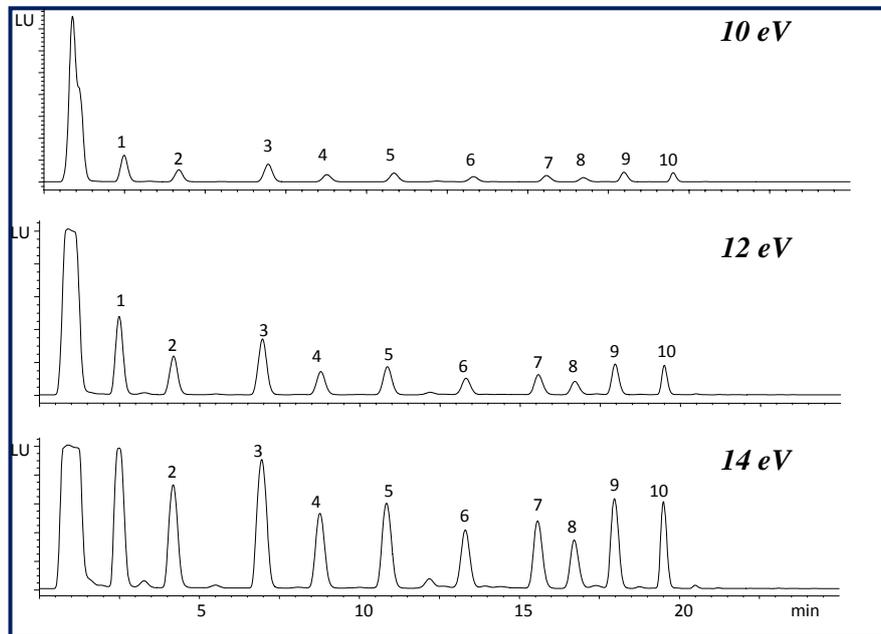


Figura 3.13- Ensayos a diferentes ganancias. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

➤ Discusión

Los resultados mostraron que al subir la ganancia se aumentaba la señal de los picos; sin embargo, se apreció que los picos tendían a igualar su intensidad a medida que se iba aumentando la cantidad de electrón voltios, lo que indicó que los picos iniciales se habían saturado. Por lo tanto, como solución de compromiso, se seleccionó la ganancia de 12 eV como la ganancia de trabajo.

2.2.5 - Optimización de la longitud de onda de excitación y de emisión

Al usar la fluorescencia (FLD) como sistema de detección de los analitos, se optimizaron las longitudes de onda de excitación y emisión. Para ello, se fijó en primer lugar una longitud de onda de excitación $\lambda_{exc} = 329 \text{ nm}$ y se hizo un barrido de emisión en busca de la longitud de onda de emisión máxima. Para localizar la longitud de onda máxima de excitación, se mantuvo fija la longitud de onda de emisión máxima obtenida en el paso anterior y se hizo un barrido de excitación.

λ_{exc} . (329 nm), barrido de emisión (300-500 nm).

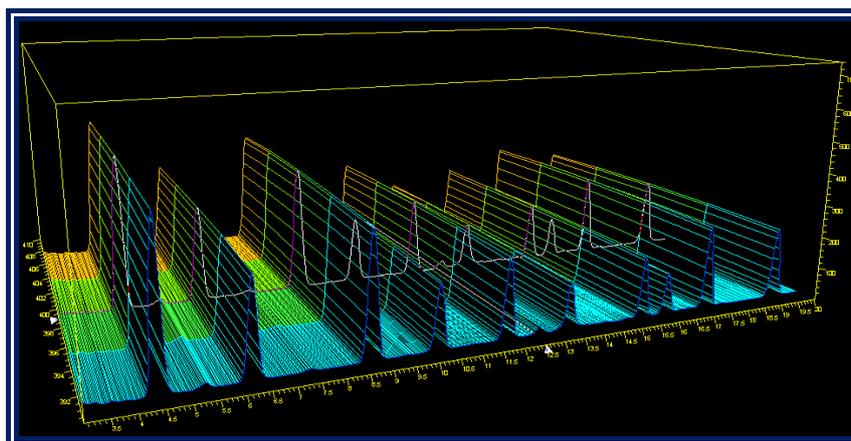


Figura 3.14- Barrido de emisión.

$\lambda_{em.}$ (398 nm), barrido de excitación (230-370 nm).

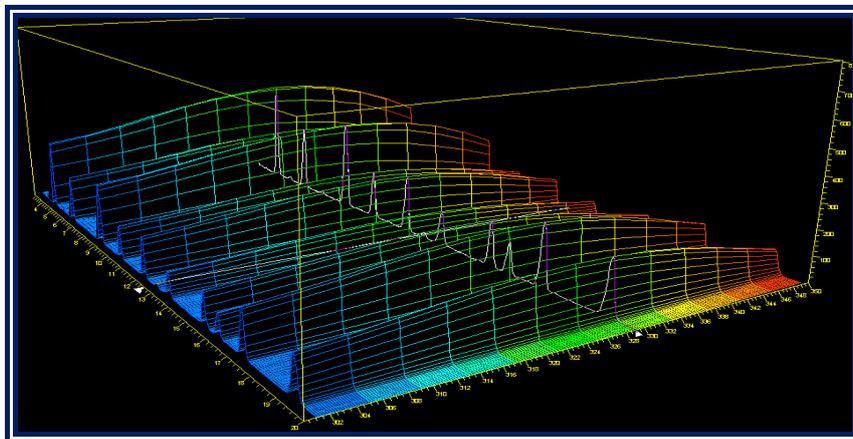


Figura 3.15- Barrido de excitación.

➤ Discusión

Según los resultados obtenidos en el 3Dplot, las longitudes óptimas fueron:

$$\lambda_{excitación} = 329 \text{ nm} \quad \lambda_{emisión} = 398 \text{ nm}$$

2.2.6 - Optimización de la composición del vial y el volumen de inyección

Dentro de la optimización de un método de cromatografía líquida, tanto el volumen de inyección como la composición del vial son parámetros de obligado estudio. El volumen de inyección afecta, fundamentalmente, a la sensibilidad, ya que a medida que se aumenta el volumen, la señal también se incrementa, y como sabemos, la sensibilidad y la señal están en directa proporción. En cuanto a la composición del vial, se sabe por experiencias previas que una composición de vial parecida a la fase móvil

inicial puede mejorar la sensibilidad de la señal y, además, se percibe, en muchos casos, una mejora en las características cromatográficas.

En el método propuesto, con objeto de asemejar la composición del vial a la fase móvil inicial, se estudió el efecto de añadir a los 3 mL (ACN) finales de la reacción de derivación, 0.5 mL de ACN (ensayo 1), 0.3 mL ACN y 0.2 mL de agua (ensayo 2), y 0.5 mL de agua (ensayo 3) a diferentes volúmenes de inyección 5 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL. De esta manera, se pretendió optimizar de manera conjunta ambas variables, ya su relación suele ser muy estrecha.

Tabla 3.17- Volúmenes de inyección y composiciones ensayadas.

VOLÚMENES	COMPOSICIÓN	ENSAYO
5 µL	0.5 ACN	Ensayo 1
5 µL	0.3 ACN + 0.2 agua	Ensayo 2
5 µL	0.5 agua	Ensayo 3
20 µL	0.5 ACN	Ensayo 4
20 µL	0.3 ACN + 0.2 agua	Ensayo 5
20 µL	0.5 agua	Ensayo 6
50 µL	0.5 ACN	Ensayo 7
50 µL	0.3 ACN + 0.2 agua	Ensayo 8
50 µL	0.5 agua	Ensayo 9
100 µL	0.5 ACN	Ensayo 10
100 µL	0.3 ACN + 0.2 agua	Ensayo 11
100 µL	0.5 agua	Ensayo 12

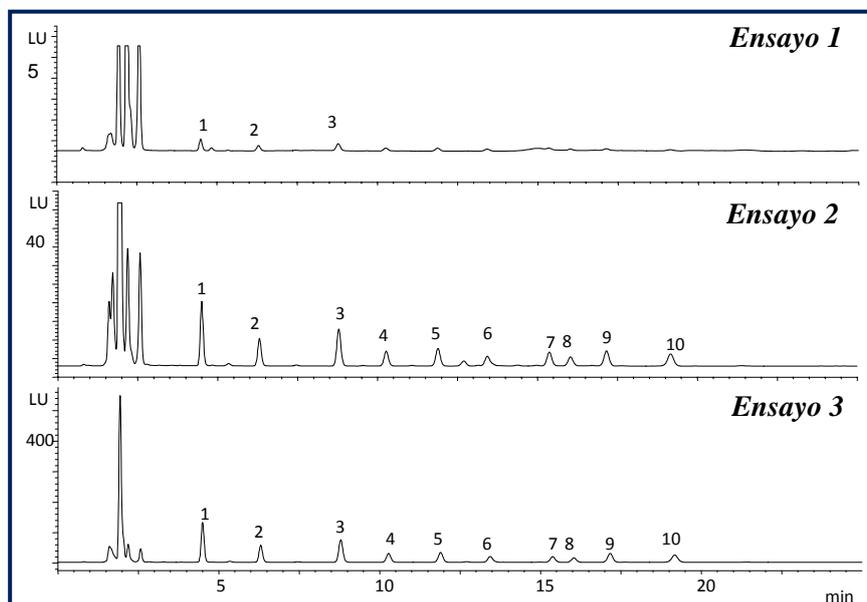


Figura 3.16- Ensayos a diferentes composiciones. 5 μ L. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

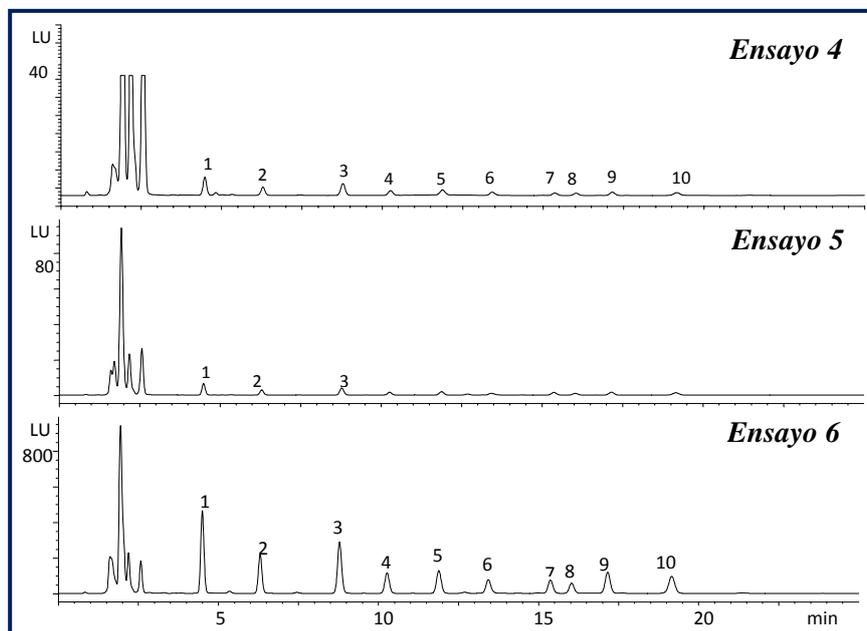


Figura 3.17- Ensayos a diferentes composiciones. 20 μ L. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

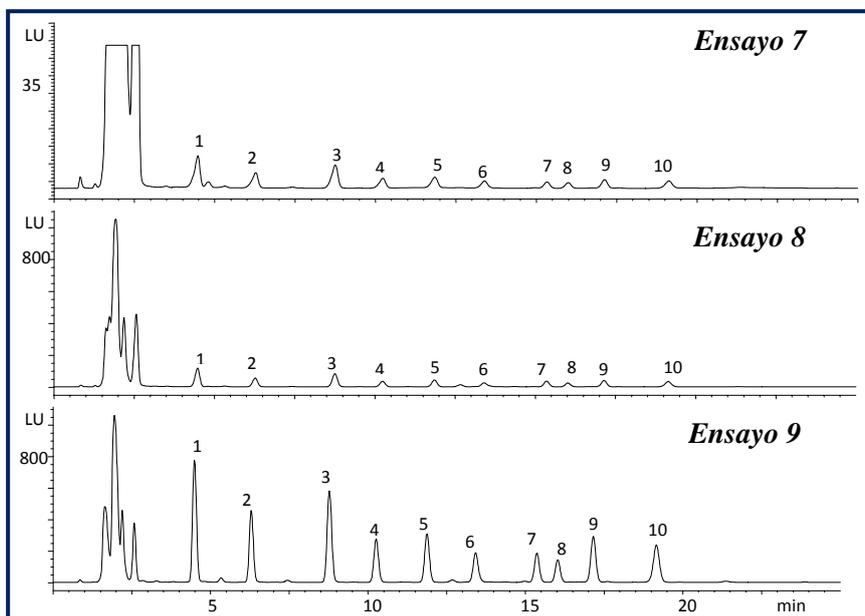


Figura 3.18- Ensayos a diferentes composiciones. 50 μ L. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

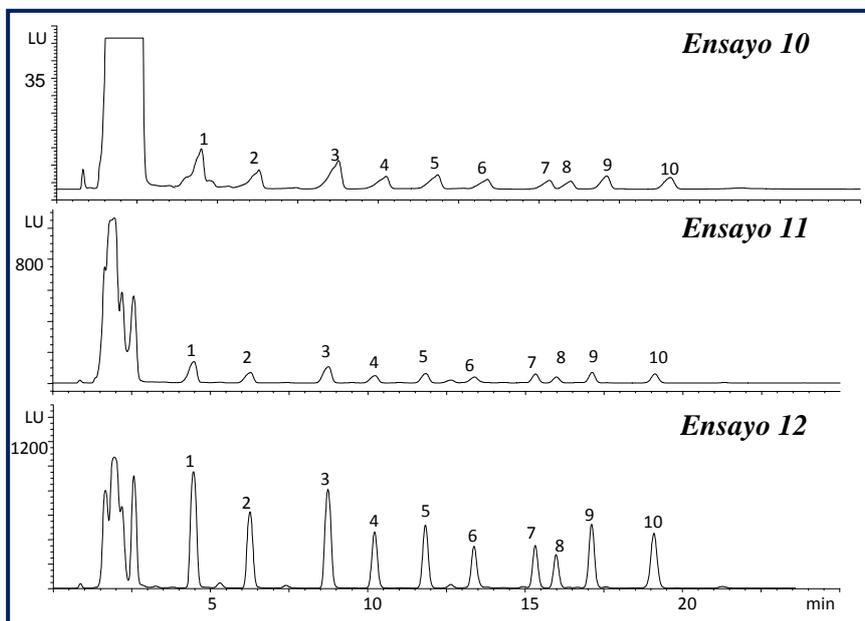


Figura 3.19- Ensayos a diferentes composiciones. 100 μ L. La nomenclatura de los picos es la misma que para la Figura 3.2.

➤ Discusión

A medida que se fueron aumentando la proporción de agua y el volumen de inyección, se obtuvieron mejores resultados (mayor sensibilidad). No se pudo aumentar más la proporción de agua, ya que a partir de 0.5 mL aparecía una turbidez debida a la insolubilidad de la BrMMC en agua. Por lo tanto, las condiciones óptimas fueron: *Vol. Inyección 100 μ L y 0.5 mL agua.*

2.2.7 - Resultados óptimos

Teniendo en cuenta todos los resultados alcanzados en los apartados anteriores, en la *Tabla 3.18*, se resumen los valores óptimos, y en la *Figura 3.20*, se muestra un cromatograma obtenido bajo esas mismas condiciones.

Tabla 3.18- Variables cromatográficas óptimas.

PARÁMETROS	ÓPTIMOS
Columna	Lichrospher RP-8 250 mm x4.6 mm
Vol. Inyección	100 μ L
Flujo	1.5 mL \cdot min ⁻¹
Temperatura	30 °C
Detección	$\lambda_{ex.}$ = 329 nm $\lambda_{em.}$ = 398 nm
Eluyentes	Canal A = Agua HPLC Canal B = ACN HPLC
Gradiente	T ₀ = 70%B T ₁₀ = 80%B T ₁₅ = 85%B T ₂₀ = 85%B T ₂₅ = 100%B
Comp. Vial	3 mL ACN y 0.5 mL agua
Ganancia	12 eV

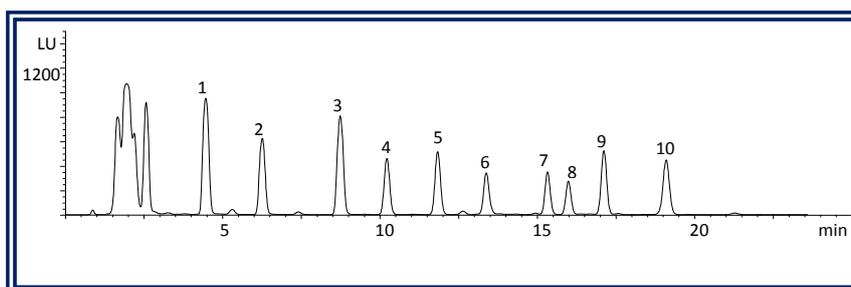


Figura 3.20- Cromatograma óptimo. Por orden: C₃K (1), C₁₀K (2), C₁₂K (3), C₁₃K (4), C₁₄K (5), C_{18:2}K (6), C₁₆K (7), C_{18:1}K (8), C₁₇K (9), C₁₈K (10).

2.3 - Optimización de la reacción de derivación para fluorescencia

2.3.1 - Justificación de la reacción de derivación

Como ya se ha comentado con anterioridad, el jabón es una sal alcalina del ácido graso. Desde el punto de vista estrictamente analítico, el jabón tiene un comportamiento parecido al ácido graso. La dificultad en la determinación del ácido graso, y por ende del jabón, se basa, fundamentalmente, en dos hechos:

- La falta de propiedad analítica sensible medible: Los ácidos grasos no tienen en su estructura ni dobles enlaces (salvo los insaturados) ni grupos aromáticos, lo que impide su análisis mediante técnicas específicas como la fluorescencia. A pesar de que presentan un pico de absorción entre 204 y 207 nm en el ultravioleta, su intensidad es poco significativa, dificultando su cuantificación a concentraciones bajas ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Por lo tanto, para su correcta determinación, hay que irse a técnicas de derivación, para de este modo, aumentar la respuesta a los diferentes sistemas de detección específicos. Otra posibilidad, sería la determinación mediante sistemas de detección universales como, por ejemplo, la espectrometría de masas.
- Alto punto de ebullición: Una de las características fundamentales del ácido graso es su alto punto de ebullición, lo que dificulta su determinación por cualquier técnica que requiera el paso a un estado gaseoso del analito (cromatografía de gases y espectrometría de masas). Aunque, actualmente, existen columnas para cromatografía de gases que son capaces de

trabajar a altas temperaturas y de determinar los ácidos grasos sin derivación, éstas son todavía muy caras, y en muchos casos se prefiere utilizar métodos de derivación, ya que son más económicas.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, la derivación es la vía más recomendable para el análisis de los ácidos grasos y de sus derivados alcalinos: el jabón.

2.3.2 - Elección de la reacción de derivación

La reacción de derivación consiste en transformar la sustancia a analizar (con pocas o nulas propiedades analíticas medible) en otro compuesto sensible a cualquiera de las técnicas de detección específica existentes. Por norma, se suele añadir, en el caso de la cromatografía líquida, un compuesto con anillos aromáticos sensible a fluorescencia y/o absorción por ultravioleta-visible, y, en el caso de la cromatografía de gases, se adiciona un grupo que aumenta la volatilidad de la molécula.

Existen multitud de agentes derivantes para la determinación de los ácidos grasos^{5,6}, tanto para cromatografía de gases como para cromatografía líquida. Esta variedad es más patente, si cabe, en la reacciones de derivación de ácidos grasos para fluorescencia, de todas, se seleccionó la reacción de derivación con 4-Bromometil-7-metoxicuramina, debido fundamentalmente a dos razones: 1) porque había sido utilizada de manera satisfactoria en la determinación de jabón^{1,2}, y 2), debido a la semejanza

⁵ Knapp D.R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Wiley-Interscience, First Edition, Pp 768, 1979.

⁶ Blau K., Halket J. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. John Wiley & Sons, Second Edition, Pp 369, 1994.

con el analito de estudio (jabón), ya que la reacción se basa en la formación previa de un jabón de tipo potásico a partir de un ácido graso, el cual es posteriormente derivado con el agente derivante (**Figura 3.21**).

En una primera etapa, el ácido graso se hace reaccionar con carbonato potásico (K_2CO_3) para dar el jabón potásico anteriormente mencionado, como medio de reacción se suele utilizar acetona. En una segunda etapa, el jabón potásico generado se hace reaccionar con el agente derivante (4-Bromometil-7-metoxicuramina) en presencia de una cantidad en exceso de Éter 18-corona-6, el cual tiene como principal función la retener los iones K^+ del jabón, liberando al medio iones $R-COO^-$, favoreciendo el mecanismo de adición-eliminación del jabón al agente derivante. El medio de reacción es también acetona.

Finalmente, cabe resaltar, que ambas etapas se suelen llevar a cabo en un solo paso, debido a que el medio de reacción es el mismo para ambas.

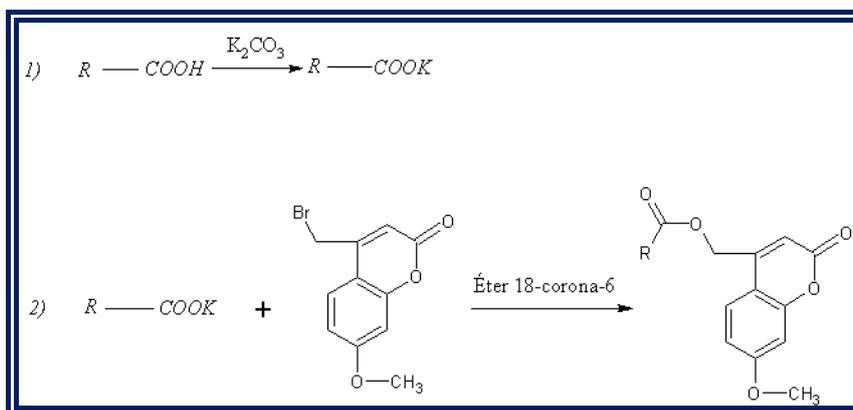


Figura 3.21- Mecanismo de reacción para la derivación de ácidos grasos. *Fluorescencia.*

2.3.3 - Elección del patrón interno

Los analitos a estudiar fueron el jabón C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆, C_{18:1}, C₁₈. A la hora de seleccionar un patrón interno, se tuvieron en cuenta diferentes aspectos: el primero de ellos, era encontrar patrones que tuvieran una estructura parecida a los analitos a determinar y, el segundo, es que no se encontraran en el ambiente, tratando de evitar posibles problemas en la cuantificación. Tanto el jabón C₁₃ como el C₁₇ cumplían ambos requisitos, ya que tenían una cadena lineal parecida a los compuestos a analizar, y por otro lado, ninguno de ellos estaba presente en el ambiente. A la hora de decantarse por uno de los dos compuestos, se optó por seleccionar el jabón C₁₃, ya que teniendo en cuenta la cadena lineal de los analitos a estudiar, el C₁₃ se ajustaba más a la media de carbonos del jabón a analizar. Por su parte, el C₁₇ se asemejaba, en número de carbonos, al jabón con cadena lineal más pesada, manteniéndose alejado de la media en longitud de cadena del analito.

Sin embargo, como más adelante se comentará, el patrón interno C₁₇ tuvo utilidad en la validación de la metodología analítica.

2.3.4 - Elección del disolvente para la reacción de derivación

En la bibliografía utilizada^{1,2,4,5}, el disolvente usado como medio de reacción fue, en todos los casos, la acetona. Durante la presente memoria se estudiaron otros disolventes para mejorar los resultados obtenidos en acetona. Con este propósito, se hicieron ensayos con diferentes disolventes, los cuales tenían que cumplir la premisa de que todos los reactivos usados (4-Bromometil-7-metoxicuramina, Éter 18-corona-6 y el jabón) fueran solubles en el mismo. Del mismo modo, se seleccionaron

disolventes compatibles y lo más parecido posible a la fase móvil usada (acetonitrilo y agua), para evitar posibles problemas de insolubilidad y/o precipitación durante el proceso de elución cromatográfica. Teniendo en cuenta estas premisas, la lista de disolventes estudiados se redujo a seis: acetona, agua, metanol, acetonitrilo, isopropanol y tetrahidrofurano.

Los disolventes con grupos OH⁻ fueron descartados, ya que eran susceptibles de dar reacciones de adición-eliminación con el agente derivante, compitiendo directamente con el jabón, con lo que, su uso podría reducir la cantidad de analito a reaccionar y podría disminuir, por ende, la sensibilidad de la reacción.

De los disolventes restantes (acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano), el tetrahidrofurano fue descartado, debido a que parte de los reactivos eran parcialmente insolubles, concretamente el agente derivante (4-Bromometil-7-metoxicuramina).

De los dos reactivos restantes (acetona y acetonitrilo) ambos eran adecuados desde el punto de vista de la solubilidad, ya que eran capaces de solubilizar grandes cantidades de todos los reactivos. Sin embargo, se seleccionó el acetonitrilo como medio de reacción principalmente por dos motivos:

- El acetonitrilo presentaba un punto de ebullición mayor que la acetona (81 °C frente a 56 °C), por lo que el uso del acetonitrilo como medio de reacción permitía trabajar a mayor temperatura de reacción, permitiendo un rango de trabajo más amplio a la hora de optimizar la temperatura de reacción.

➤ El acetonitrilo presentaban una mejor resolución en los picos cromatográficos, este hecho era debido a que el acetonitrilo era uno de los eluyentes seleccionados para llevar a cabo la separación cromatográfica. (**Figura 3.22**)

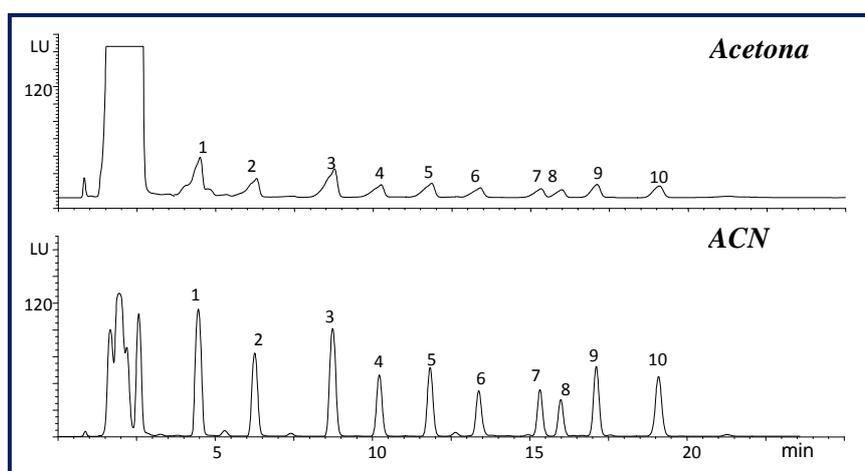


Figura 3.22- Cromatograma obtenido con acetona y acetonitrilo como medio. Por orden de elución: C_8K (1), $C_{10}K$ (2), $C_{12}K$ (3), $C_{13}K$ (4), $C_{14}K$ (5), $C_{18:2}K$ (6), $C_{16}K$ (7), $C_{18:1}K$ (8), $C_{17}K$ (9), $C_{18}K$ (10).

2.3.5 - Optimización del tiempo y la temperatura de reacción

Para la optimización del tiempo y temperatura de reacción, se llevó a cabo un estudio de ambas variables de manera conjunta. El estudio consistió en la creación de un diseño experimental en superficie de respuesta (DSR), el cual se emplea para determinar valores óptimos de factores en un sistema analítico en concreto. Dentro de esta clase, para simplificar el experimento, se recurrió a la elección de un diseño cúbico ortogonal centrado en el cuerpo (**Figura 3.23**). El ensayo constó de nueve puntos (uno de ellos central), siendo seleccionada, como variable de

respuesta, el área del patrón, conteniendo un número de factores experimentales de dos (tiempo y temperatura).

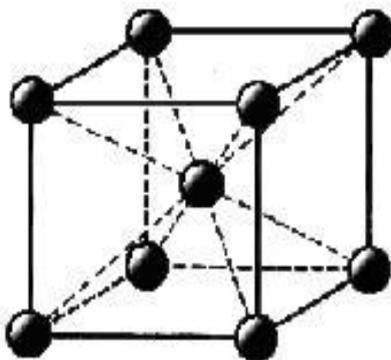


Figura 3.23. Sistema cúbico centrado en el cuerpo.

Los máximos y mínimos de los factores experimentales, se seleccionaron de acuerdo con las posibilidades del sistema. Por lo tanto, para la temperatura, el valor mínimo fue de 25 °C (temperatura ambiente del laboratorio) y el máximo de 125 °C (a partir de esta temperatura, se generaban problemas de sobrepresión en el vial de reacción). Del mismo modo, se estableció un mínimo de 5 minutos y un máximo de 90 minutos para el factor experimental tiempo.

El diseño de superficie de respuesta final utilizado se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 3.19- Diseño experimental para tiempo y temperatura.

TIEMPO (MIN)	TEMPERATURA (°C)
25	5
75	47.5
125	90
25	5
75	47.5
125	90
25	5
75	47.5
125	90

El diseño se llevó a cabo con una mezcla de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de diferentes tipos de jabón potásico ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$), usando como patrón interno $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de jabón C_{13} .

La evaluación de los resultados se basó en el estudio de ciertos parámetros como el gráfico de Pareto, el análisis de la varianza, el gráfico de la superficie de respuesta y el óptimo calculado.

El primer parámetro a estudiar fue el gráfico de Pareto, el cual indicó qué variables tenían un nivel de significancia lo suficientemente alto como para ser representativas en el sistema propuesto. Según los resultados obtenidos, para todos los compuestos estudiados, la única variable significativa fue la temperatura (**Figura 3.24**), siendo, el tiempo, bajo este diseño, comparativamente poco significativo frente a la temperatura. Por lo que sólo se consideró el óptimo calculado para la temperatura. El menor tiempo posible fue considerado el valor óptimo para el tiempo, en

este caso 5 min, teniendo en cuenta, que con anterioridad, se comprobó que a tiempo inferiores a cinco minutos la reacción no se llevaba a cabo de manera significativa.

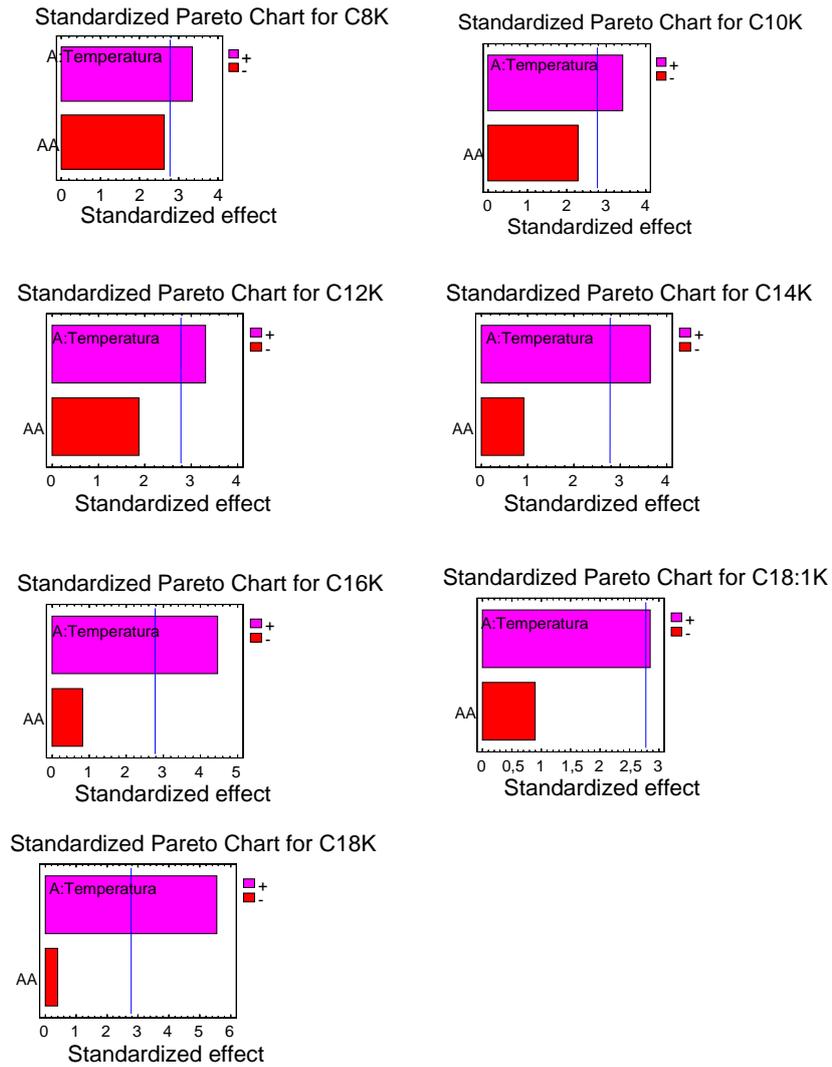


Figura 3.24- Gráficas de Pareto del jabón para fluorescencia.

El siguiente parámetro estudiado fue el análisis de la varianza, concretamente el valor del R^2 , este valor nos permitió dilucidar la idoneidad del diseño aplicado, es decir, valores altos de R^2 nos indicaba que el modelo propuesto (cúbico centrado en el cuerpo) se ajustaba de manera adecuada al sistema analítico en cuestión. Para todos los tipo de jabón, el valor calculado fueron siempre superior al 80%.

Tabla 3.20- Análisis de la varianza. Valores de R^2 .

JABÓN	R^2 (%)
C ₈ K	82
C ₁₀ K	82
C ₁₂ K	80
C ₁₄ K	81
C ₁₆ K	85
C _{18:1} K	81
C ₁₈ K	90

A continuación, se estudió la superficie de respuesta obtenida para cada tipo de jabón. La superficie suele indicar de manera gráfica cuál es el óptimo de las condiciones propuestas, este óptimo se percibe de manera visual por un punto de inflexión máximo. El óptimo (*Tabla 3.21*) fue calculado maximizando la ecuación de la curva que da lugar a la representación de la superficie de respuesta (*Figura 3.25*).

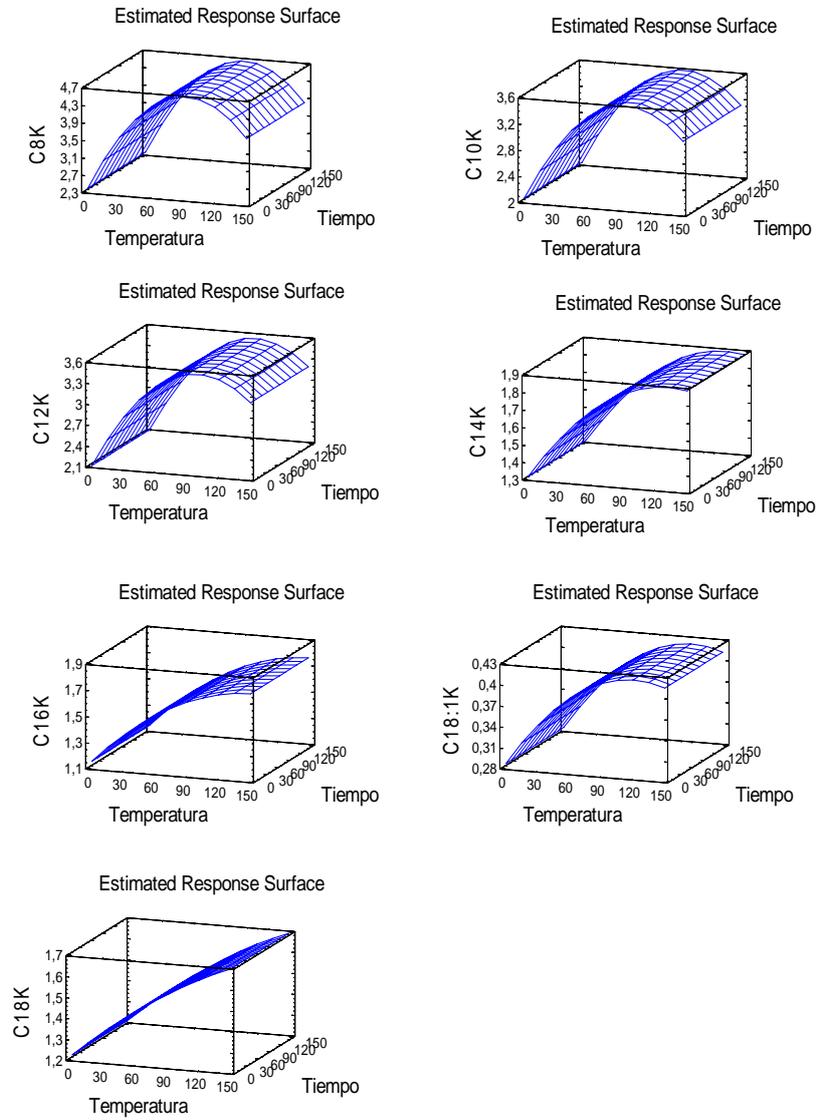


Figura 3.25- Superficies de respuesta del jabón para fluorescencia.

Tabla 3.21- Valores de los óptimos obtenidos en el diseño.

JABÓN	ÓPTIMO (°C)
C ₈ K	93
C ₁₀ K	97
C ₁₂ K	100
C ₁₄ K	125
C ₁₆ K	125
C _{18:1} K	121
C ₁₈ K	125

A la vista de los resultados obtenidos, cabe resaltar, que a medida que fue aumentando el tamaño de la cadena lineal del jabón, el óptimo alcanzaba mayor valor, este hecho se puede explicar, debido a que la reacción de derivación se daba mejor a medida que la cadena lineal era más corta (mayor carácter nucleofílico), necesitando, por tanto, menor aporte energético (temperatura) para llevarse a cabo de manera satisfactoria.

Para dilucidar que óptimo seleccionar para llevar a cabo la reacción (diferentes óptimos), se recurrió a sumar todos las variables respuesta de todos los tipos de jabón para cada nivel del diseño, obteniéndose sólo una variable respuesta para cada nivel. Una vez calculada la variable, se volvió a aplicar el mismo diseño de superficie de respuesta. Con lo que, al final, se obtuvo una única gráfica de Pareto, un único valor de R², una única superficie de respuesta y un único óptimo, el cual fue calculado teniendo en cuenta los valores individuales de cada tipo de jabón (**Figura 3.26 y Tabla 3.22**).

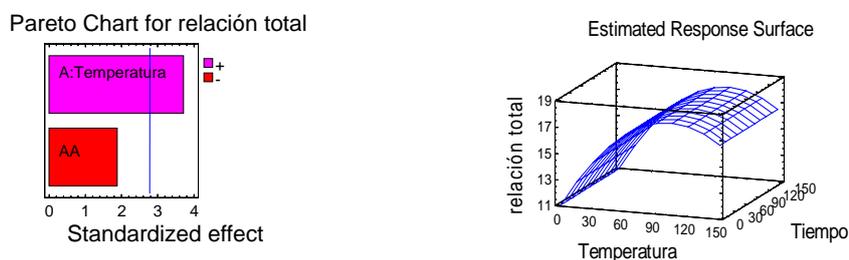


Figura 3.26- Gráfica de Pareto y superficie de respuesta de la relación total para fluorescencia.

Tabla 3.22- Valores del R^2 y óptimo obtenidos en el diseño para la relación total.

JABÓN	R^2 (%)	ÓPTIMO (°C)
Relación total	85	103

Por lo tanto, los óptimos para tiempo y temperatura fueron:

Tabla 3.23- Valores óptimos para tiempo y temperatura.

	TIEMPO (MIN.)	TEMPERATURA (°C)
Óptimo	5	103

2.3.6 - Optimización del volumen de reacción y de la cantidad de reactivos

En primer lugar, se tuvieron en cuenta tanto las cantidades de reactivos usados en la bibliografía de partida como los volúmenes optimizados durante el proceso cromatográfico (1.5 mL de BrMMC al 0.1% m/m en ACN y 1.5 mL de Éter 18-corona-6 al 0.21 % m/m en ACN más 0.5 mL

de agua después de la reacción). Estas condiciones presentaban un buen comportamiento a la concentración de ensayo ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de patrón interno). Sin embargo, a la hora de llevar a cabo un calibrado, su comportamiento variaba. De tal modo que, por encima de la concentración de ensayo, se perdía linealidad, dificultando la cuantificación de los analitos. De la misma manera, a concentraciones pequeñas ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) la relación de áreas también se veía alterada con pérdida de sensibilidad y de linealidad. Los resultados demostraron, por tanto, que bajo estas condiciones sólo se podía trabajar en un rango comprendido entre $1\text{-}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Este rango era claramente insuficiente para los objetivos planteados inicialmente, y también para el número, complejidad y variedad de las muestras a analizar.

Tabla 3.24- Linealidades obtenidas para patrones de jabón en las condiciones iniciales.

JABÓN	LINEALIDAD PARA TRES NIVELES DE CONCENTRACIÓN (R^2)
C ₈ K	0.65
C ₁₀ K	0.68
C ₁₂ K	0.64
C ₁₄ K	0.75
C ₁₆ K	0.71
C _{18.1} K	0.62
C ₁₈ K	0.73

La conclusión fue volver a optimizar tanto el volumen de reacción como la cantidad de reactivos, con el objeto de aumentar el rango dinámico lineal hasta llevarlo a valores comprendidos entre $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para la optimización, se tuvieron en cuenta varias premisas: la primera,

fue que, según los cromatogramas obtenidos (**Figura 3.27**), a medida que se aumentaba la proporción de agua después de la reacción y se disminuía, por tanto, la de acetonitrilo, la sensibilidad analítica aumenta y la linealidad se ajusta más a lo esperado. Y la segunda, como ya se indicó anteriormente, que un aumento de la cantidad de agua llevaba implícito una disminución de la solubilidad del agente derivante (BrMMC), con el consiguiente peligro de obturación de la columna cromatográfica.

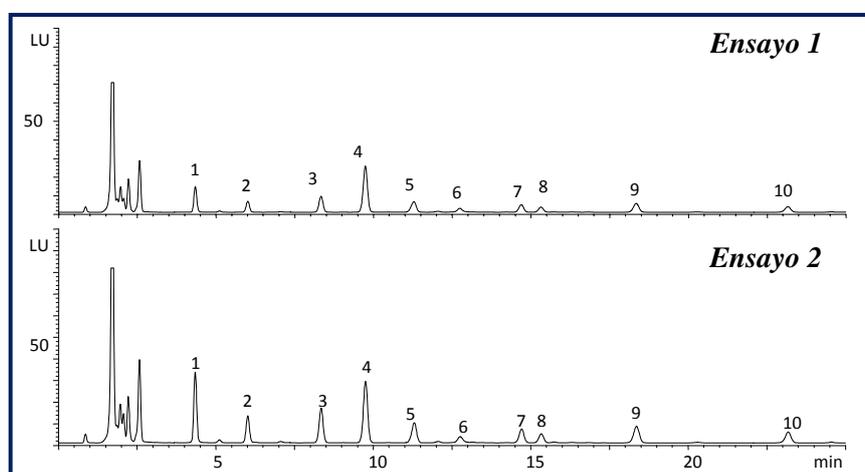


Figura 3.27- Cromatograma obtenido para $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de jabón. **Ensayo 1:** 3.5mL de volumen final (1.25 mL de acetonitrilo y 1.25 de agua). **Ensayo 2:** 3.5 mL de volumen final (3 mL de acetonitrilo y 0.5 de agua). Por orden de elución: C_8K (1), C_{10}K (2), C_{12}K (3), C_{13}K (4), C_{14}K (5), $\text{C}_{18:2}\text{K}$ (6), C_{16}K (7), $\text{C}_{18:1}\text{K}$ (8), C_{17}K (9), C_{18}K (10).

Teniendo en cuenta ambas premisas, el objetivo que se planteó fue conseguir añadir la mayor cantidad posible de agua después de la reacción, disminuyendo al máximo permitido el volumen de acetonitrilo usado y la cantidad de reactivos.

El volumen óptimo de agua se obtuvo mediante adición de diferentes cantidades después de la reacción de derivación, según los datos generados (**Tabla 3.25**), se comprobó que la linealidad se mantenía en valores óptimos siempre y cuando el vial inyectado en el cromatógrafo tuviera al menos en su composición un 95% de agua.

Tabla 3.25- Linealidad para jabón $C_{16}K$ a diferentes composiciones de vial.

Linealidad para cuatro niveles de concentración (R^2)	Composición del vial (% en agua)
0.66	10
0.79	20
0.84	40
0.89	80
0.93	90
0.99	95
0.99	99

Posteriormente, se optimizó la cantidad de agente derivante, ya que, como se ha comentado, una alta proporción de agua conlleva la aparición de un precipitado, el cual estaba provocado por la insolubilidad de la BrMMC en agua, con lo que se aumentaba la presión en columna.

Desde un punto de vista estequiométrico, las cantidades de reactivos de partida estaban en exceso. Para obtener el óptimo, se realizó un ensayo conjunto a diferentes concentraciones de reactivos con el mínimo volumen de acetonitrilo posible (100 μ L de disolución de BrMMC y 100 μ L de disolución de éter corona). Una cantidad menor a 200 μ L, redundaba en un aumento del error instrumental analito asociado al pipeteo y a la pérdida de analito, sin que esta disminución aumentara de

forma significativa la linealidad de la reacción de derivación con respecto a un volumen propuesto de 200 μL .

Por tanto, el ensayo se llevó a cabo a tres diferentes niveles de concentración de BrMMC (0.1, 0.2 y 0.3% m/m) y a otros tres diferentes niveles de concentración de éter corona (0.2, 0.5 y 0.75% m/m). Los niveles más altos de concentración se seleccionaron de acuerdo con el máximo de solubilidad de los reactivos en acetonitrilo (0.3% m/m para la BrMMC y 0.75% m/m para el éter corona). La reacción se aplicó a cuatro disoluciones de jabón con concentración dispar ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Una vez llevada a cabo la reacción, se añadió agua (3.8 mL) hasta llegar al porcentaje óptimo de agua anteriormente calculado (95%). Finalmente, se inyectó en el cromatógrafo.

El óptimo se seleccionó de acuerdo con el valor de linealidad más alto, siendo este, según los resultados (**Tabla 3.26**), 0.2% m/m en BrMMC y 0.5% m/m en éter corona. Cabe destacar, que la cantidad de BrMMC del óptimo calculado era 7.5 veces menor a la usada por el método inicial (1.5 mL de BrMMC al 0.1% m/m frente a 100 μL de BrMMC al 0.2%), con lo que se disminuyó de manera notable el riesgo de insolubilidad del agente derivante en agua.

Tabla 3.26- Linealidad para el jabón C₁₆K a diferentes concentraciones de reactivos.

Cantidad de BrMMC (% m/m)	Cantidad de éter corona (% m/m)	Linealidad para cuatro niveles de concentración (R ²)
0.1	0.2	0.89
0.1	0.5	0.91
0.1	0.75	0.90
0.2	0.2	0.95
0.2	0.5	0.99
0.2	0.75	0.97
0.3	0.2	0.96
0.3	0.5	0.94
0.3	0.75	0.98

En la **Tabla 3.27**, se resumen los óptimos obtenidos para volumen de reacción, concentración de reactivos y porcentaje de agua añadido.

Tabla 3.27- Óptimos obtenidos para volumen de reacción, concentración de reactivos y porcentaje de agua añadido.

VARIABLES	ÓPTIMOS
Volumen de reacción	200 µL (100 BrMMC y 100 éter corona)
Concentración de BrMMC	0.2 % m/m
Concentración de BrMMC	0.5 % m/m
Porcentaje de agua añadido después reacción.	95 %

2.3.7 - Cantidad máxima de analito a derivar

Para llevar a cabo la reacción de derivación se partió de una disolución de mezcla de jabón potásico de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en metanol, como ya se ha indicado los disolventes con grupos OH son susceptibles de ser competencia para la reacción de derivación, por lo tanto, la reacción se tenía que realizar en ausencia de metanol. Teniendo en cuenta este hecho, el primer paso de la derivación fue evaporar el metanol presente mediante evaporación con corriente de N_2 . La cantidad máxima de analito a derivar (volumen a evaporar de la disolución metanólica patrón) fue un parámetro a optimizar, ya que a medida que se aumentaba el volumen a evaporar, también se preconcentraba la cantidad de analito, con lo que se veía aumentada, por ende, la sensibilidad del método.

El volumen de microreactor era de 10 mL, por lo que 10 mL era el máximo volumen a preconcentrar. Sin embargo, teniendo en cuenta el poco volumen de reacción usado ($200 \mu\text{L}$), parecía, a priori, difícil que en un volumen de reacción tan pequeño se pudiera disolver toda la cantidad de analito residente después de evaporar 10 mL de disolución patrón de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Debido a este hecho, se llevó a cabo un cálculo del máximo volumen de disolución a evaporar (cantidad de analito). El objetivo que se marcó fue evaporar la mayor cantidad de volumen posible (mayor sensibilidad analítica), sin que esto pudiera incurrir en una pérdida de analito a determinar. Para determinar la cantidad de analito máxima, se recurrió a evaporar diferentes volúmenes de patrón (desde 0.5 a 10 mL), comparando entre sí el área obtenida de un analito en concreto (C_{16}K) después de la derivación. Para corregir los diferentes factores de dilución, se añadió diferentes cantidades de agua después de la reacción y antes de la inyección hasta que todos los volúmenes ensayados tuvieron la misma

concentración cromatográfica ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se seleccionó, como volumen máximo, el volumen, a partir del cual se perdía cantidad de analito a determinar (**Tabla 3.28**). Según los datos obtenidos, fue seleccionado como máximo un volumen de 2 mL.

Tabla 3.28- Determinación de la cantidad máxima de materia a derivar.

Volumen evaporado (patrón de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en mL	Área C_{16}K
0.5	1235
1	1248
2	1256
4	1032
6	924
8	835
10	715

Tabla 3.29- Máxima cantidad de analito a derivar.

Cantidad máxima de analito a derivar	2 mL de una disolución de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mezcla de jabón
---	--

2.3.8 - Estudio de la estabilidad de la reacción de derivación

Según la biografía antes mencionada, el agente derivante (BrMMC) era fotosensible, con lo que la reacción podría degradarse con el tiempo. Debido a este hecho, se realizó un estudio de la estabilidad de la reacción frente al tiempo. Para comprobar este fenómeno, se derivó una mezcla de jabón de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y se inyectó a varios tiempos (hasta 150 horas). En la

siguiente gráfica, se muestran los resultados obtenidos. Se observó como la relación de área se mantuvo estable durante todo el tiempo del ensayo (150 horas), exceptuando los casos de C_{18:1}K y el C_{18:2}K, en los cuales a partir de 70 horas se producía una disminución de la relación de áreas. Esta particularidad se explicó, debido a la mayor degradación de los ácidos grasos insaturados, y de sus correspondientes derivados jabonosos. No obstante, teniendo en cuenta este factor, la reacción, en términos generales, se consideró muy estable, ya que no se apreció un cambio significativo en la relación de áreas en las primeras 70 horas después de la reacción.

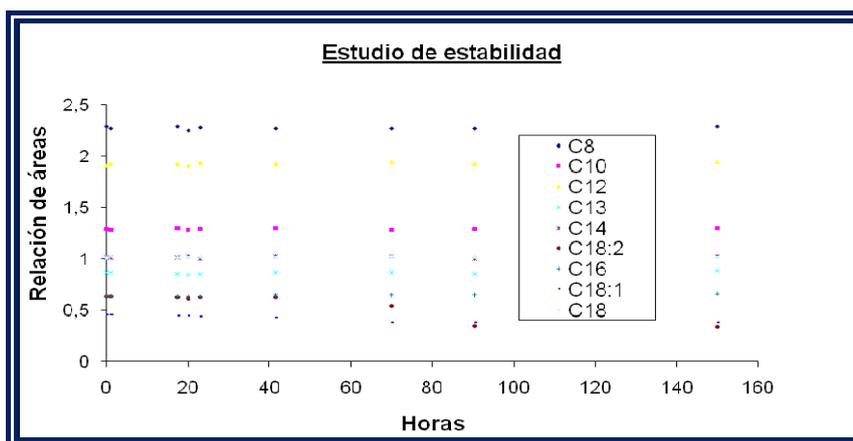


Figura 3.28- Relación de áreas de los analitos derivados frente al tiempo.

2.3.9 - Resumen del protocolo de derivación optimizado

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en este apartado, se resume el protocolo de derivación ya optimizado.

- Añadir, a un microreactor, 2 mL de una disolución metanólica de patrón de jabón potásico o muestra a analizar.
- Añadir 1 mL de una disolución ($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de patrón interno (C_{13}K) en metanol.
- Evaporar el volumen (3 mL) hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Añadir 100 μL de disolución de BrMMC (0.2% m/m en acetonitrilo) y 100 μL de disolución de éter corona (0.5% m/m en acetonitrilo).
- Calentar a 103 °C durante 5 minutos.
- Añadir 3.8 mL de agua, volumen final de 4mL.
- Inyectar en el cromatógrafo de líquidos.

2.3.10 - Prueba de derivación en muestra real

Antes de proceder a una validación de la metodología propuesta, se decidió testar tanto el protocolo de derivación como las variables cromatográficas en una muestra real. Para llevar a cabo este ensayo, se siguió el protocolo de tratamiento de la muestra y extracción descrito en bibliografía¹, al cual se le aplicó el protocolo de derivación y la separación cromatográfica obtenidas en esta Memoria de Tesis.

La muestra seleccionada para aplicar el ensayo fue lodo de una planta de la EDAR de Estepona, la cual fue tomada después del digestor anaerobio. La razón por la cual se seleccionó una muestra de lodo, fue debida a que los lodos iban a ser las muestras más complejas a determinar, dado que su proporción de posibles interferentes era ampliamente mayor a la que pudiera haber en cualquier otro tipo de muestra ambiental (tierra, sedimentos de río y de mar). Por lo tanto, si se obtenía una buena

separación de los analitos en los lodos, este resultado se podía extrapolar al resto de muestras ambientales.

El cromatograma obtenido (*Figura 3.29*) demostraba una adecuada separación de los analitos objeto de estudio, por lo que, la metodología propuesta para la derivación y la separación se adecuaba correctamente a las muestras a analizar durante la presente Memoria.

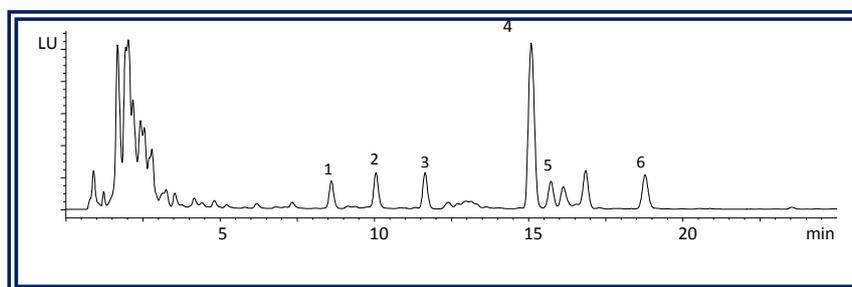


Figura 3.29- Cromatograma obtenido en muestra real de lodo. Por orden de elución: $C_{12}K$ (1), $C_{13}K$ (2), $C_{14}K$ (3), $C_{16}K$ (4), $C_{18.1}K$ (5), $C_{18}K$ (6).

2.4 - Optimización de la reacción de derivación para ultravioleta

2.4.1 - Justificación y elección de la reacción de derivación

Desde un punto meramente analítico, la justificación de la reacción de derivación se fundamenta en los mismos términos que se han comentado en el apartado anterior de la presente Memoria. Sin embargo, una vez puesto a punto un método basado en detección por fluorescencia, se propuso ampliar el campo analítico con el desarrollo de una metodología por absorción ultravioleta.

El motivo por el cual se seleccionó la absorción ultravioleta, se fundamentó en la casi universalidad del sistema de detección, ya que la mayoría de los equipos de cromatografía líquida vienen asociados a un sistema de detección por ultravioleta, mientras que sólo una pequeña parte de los cromatografos están acoplados a un detector de fluorescencia. Por lo tanto, la puesta a punto de una reacción de derivación por ultravioleta sería, desde un punto de vista meramente práctico, más rentable que por fluorescencia.

Para seleccionar la reacción de derivación, se tuvieron en cuenta las mismas premisas que para fluorescencia. No obstante, cabe destacar que hasta el momento, y a diferencia de la fluorescencia, no se había aplicado ninguna de las reacciones de derivación por absorción ultravioleta existentes para ácidos grasos a la determinación de jabón.

La reacción elegida vino descrita en la bibliografía anteriormente comentada⁴, la cual constaba, al igual que para fluorescencia, de dos etapas.

En una primera etapa, el ácido graso se hace reaccionar con hidróxido sódico (NaOH) para dar el jabón potásico, como medio de reacción se suele utilizar acetona. En una segunda etapa, el jabón potásico generado se hace reaccionar con el agente derivante (2,4- dibromoacetofenona) en presencia de una cantidad en exceso de éter 18-corona-6, el cual tiene como principal función la de retener los iones K^+ del jabón, liberando al medio iones $R-COO^-$, lo cual favorece el mecanismo de adición-eliminación del jabón al agente derivante. El medio de reacción es también acetona.

Finalmente, cabe resaltar, al igual que en fluorescencia, que ambas etapas se suelen llevar a cabo en un solo paso, debido a que el medio de reacción es el mismo para ambas.

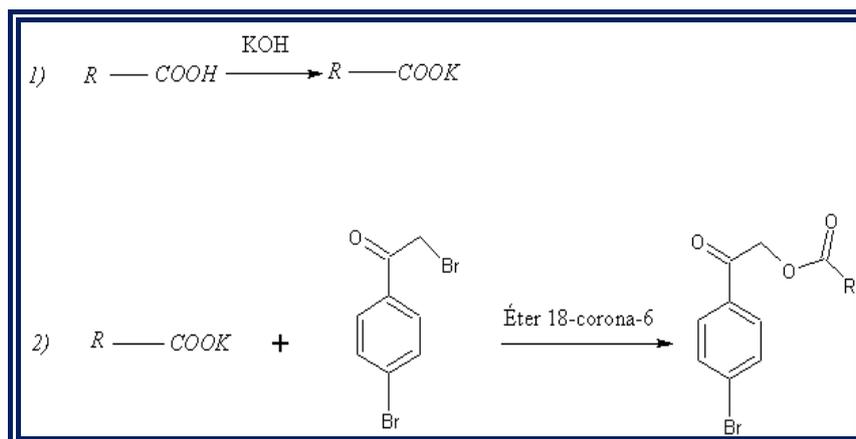


Figura 3.30- Mecanismo de reacción para la derivación de ácidos grasos.

2.4.2 - Método cromatográfico. Selección de la longitud máxima de absorción

Debido a la similitud tanto en la reacción de derivación como en la estructura del agente derivante, se optó, en primer lugar, en hacer una prueba con el método cromatográfico propuesto para fluorescencia. La prueba se realizó con la reacción base descrita en bibliografía:

Protocolo de derivación:

1. Se disolvió una mezcla de jabón potásico (C_8K - C_{18}K) en metanol ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

2. Se pipeteó una cantidad de la disolución metanólica (3 mL). Se evaporó hasta sequedad.
3. Se añadió 1.5 mL de disolución de 2,4-dibromoacetofenona (DAP) al 0.5% m/m en acetona y 1.5 mL de disolución de 18-éter-6-corona al 0.1% m/m en acetona.
4. Se calentó a 80 °C durante 30 minutos.
5. Se inyectó en el cromatógrafo de líquidos con detección por absorción molecular a 254 nm

El cromatograma obtenido reflejó (**Figura 3.31**), aunque existe pequeñas variaciones en los tiempos de retención, el método cromatográfico propuesto era igual de válido para ambas técnicas de derivación.

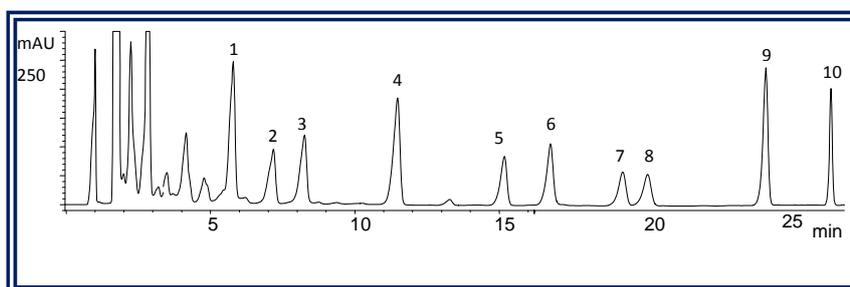


Figura 3.31- Cromatograma obtenido para $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mezcla de jabón. Por orden de elución: C_8K (1), C_{10}K (2), C_{12}K (3), C_{13}K (4), C_{14}K (5), $\text{C}_{18:2}\text{K}$ (6), C_{16}K (7), $\text{C}_{18:1}\text{K}$ (8), C_{17}K (9), C_{18}K (10).

La única variable cromatográfica que no se podía extrapolar de fluorescencia a absorbancia era la relativa al detector. Por lo tanto, se optimizó la longitud de onda máxima de absorción de los analitos. Para ello, se hizo un barrido de longitud de onda desde 190 nm a 400 nm.

Según la gráfica (*Figura 3.32*) obtenida el máximo de absorbancia para nuestros analitos estaba situado a 258 nm.

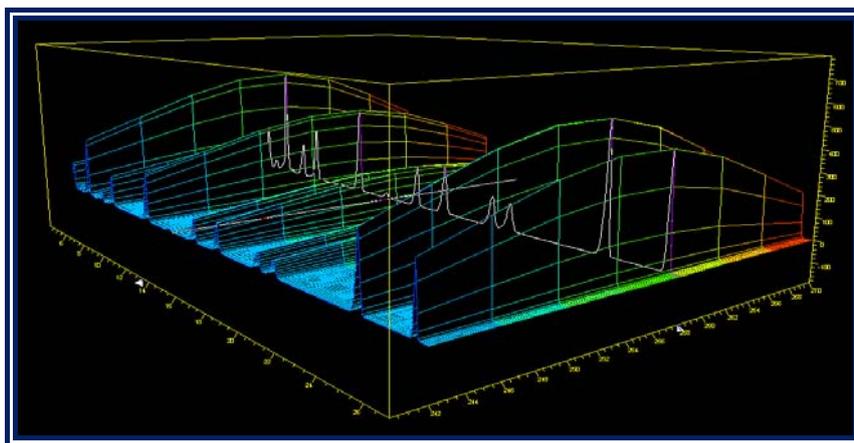


Figura 3.32- Espectro de absorción para mezcla de jabón.

2.4.3 - Elección del disolvente de la reacción de derivación y del patrón interno

De la misma manera que en el *Apartado 2.3.4* del presente Capítulo, se llegó a la conclusión que los dos medios de reacción más aconsejables eran la acetona y el acetonitrilo, ya que ambos solubilizaban a los reactivos de la reacción de derivación. Se seleccionó el acetonitrilo como medio de reacción por mismos motivos expuestos en el *Apartado 2.3.4* (*Figura 3.33*).

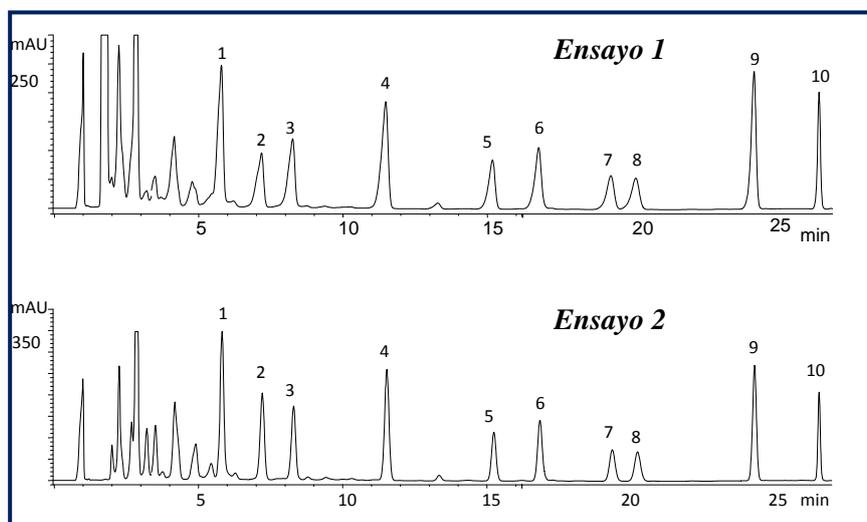


Figura 3.33- Cromatograma obtenido para $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mezcla de jabón. *Ensayo 1:* acetona. *Ensayo 2:* acetonitrilo. Por orden: C_8K (1), C_{10}K (2), C_{12}K (3), C_{13}K (4), C_{14}K (5), $\text{C}_{18:2}\text{K}$ (6), C_{16}K (7), $\text{C}_{18:1}\text{K}$ (8), C_{17}K (9), C_{18}K (10).

Cabe destacar, que la solubilidad del agente derivante usado para absorción ultravioleta (DAP) era sensiblemente mejor que la del reactivo de fluorescencia (BrMMC).

En cuanto al patrón interno, se seleccionó el C_{13}K , basándose en las mismas razones expuestas en el **Apartado 2.3.3** de este Capítulo. Sin embargo, debido a la menor sensibilidad de la detección por absorción (en torno a 10 veces menor que fluorescencia), se tuvo que ampliar el rango de dinámico lineal con respecto a la fluorescencia (entre 0.2 y 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en fluorescencia a entre 2 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en absorción ultravioleta). Al ampliarse el rango, también se varió la concentración (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en fluorescencia) de patrón interno, seleccionándose 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para absorción ultravioleta.

2.4.4 - Optimización del tiempo y la temperatura de reacción

Para la optimización del tiempo y temperatura de reacción, se llevó a cabo un estudio de ambas variables de manera conjunta. El estudio consistió en la creación de un diseño experimental en superficie de respuesta (DSR). Dada la similitud con la reacción de derivación, se optó por usar el mismo modelo, los mismos parámetros y los mismos niveles descritos en el *Apartado 2.3.5*. La única variación fue en la variable respuesta, que en este caso, a diferencia de fluorescencia, se seleccionó, al igual que en fluorescencia el área del analito.

El diseño se llevó a cabo con una mezcla de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de diferentes tipos de jabón potásico ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$), usando como patrón interno $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de jabón C_{13} .

La evaluación de los resultados se basó en el estudio de ciertos parámetros como el gráfico de Pareto, el análisis de la varianza, el gráfico de la superficie de respuesta y el óptimo calculado.

El primer parámetro a estudiar fue el gráfico de Pareto. Según los resultados obtenidos, para todos los compuestos estudiados, la única variable significativa fue la temperatura (*Figura 3.34*), siendo, el tiempo, bajo este diseño, comparativamente poco significativo frente a la temperatura. Por lo que, sólo se consideró el óptimo calculado para la temperatura. El menor tiempo posible fue considerado el valor óptimo para el tiempo, en este caso 5 min, teniendo en cuenta, que con anterioridad al igual que en fluorescencia, se comprobó que a tiempo inferiores a cinco minutos la reacción no se llevaba a cabo de manera significativa.

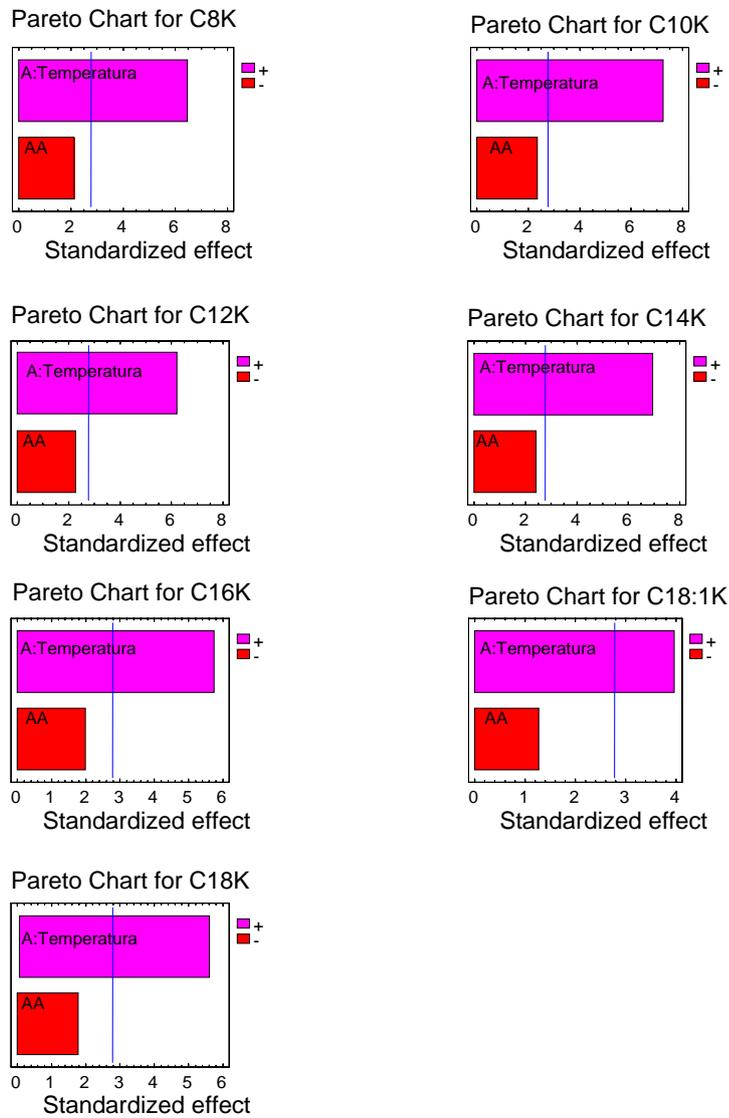


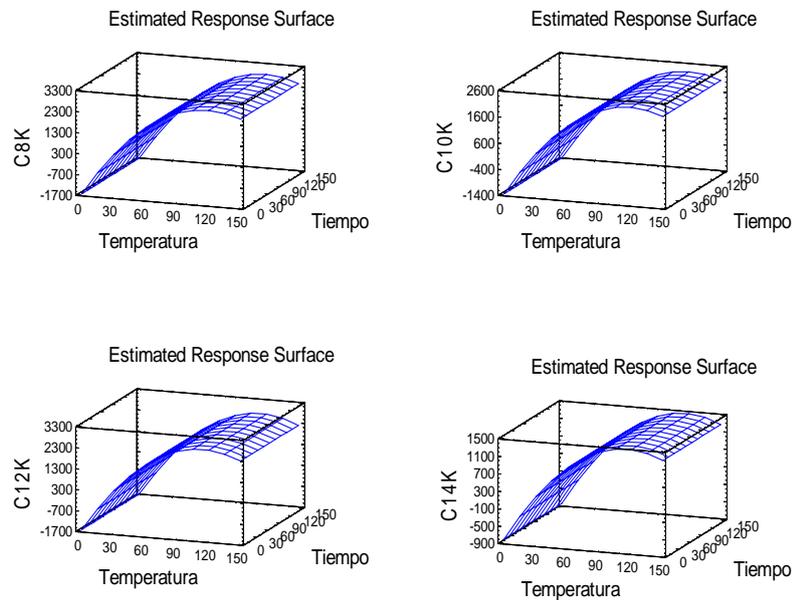
Figura 3.34- Gráficas de Pareto del jabón.

El siguiente parámetro estudiado fue el análisis de la varianza, concretamente el valor del R^2 . Para todos los tipos de jabón, el valor calculado fue siempre superior al 85%.

Tabla 3.30- Análisis de la varianza. Valores de R^2 .

JABÓN	R^2 (%)
C ₈ K	92
C ₁₀ K	94
C ₁₂ K	92
C ₁₄ K	91
C ₁₆ K	88
C _{18:1} K	85
C ₁₈ K	90

A continuación, se estudió la superficie de respuesta obtenida para cada tipo de jabón. El óptimo (*Tabla 3.31*) fue calculado maximizando la ecuación de la curva que da lugar a la representación de la superficie de respuesta (*Figura 3.35*).



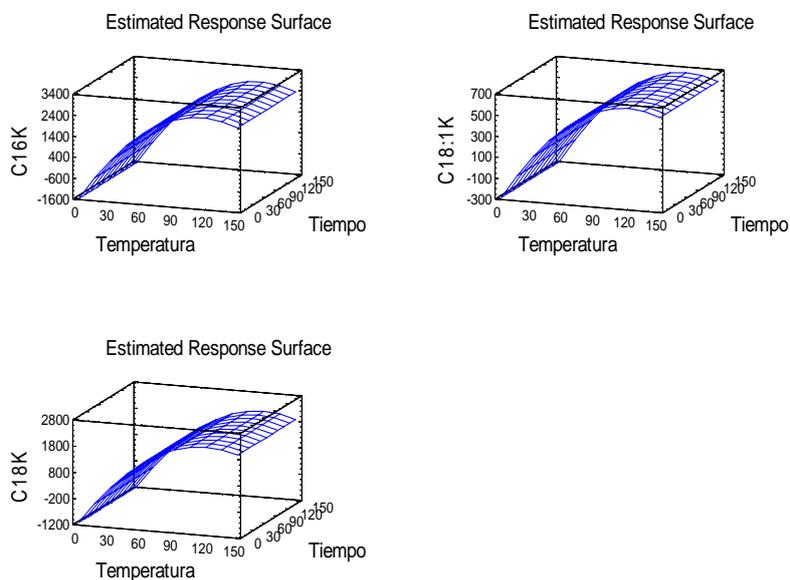


Figura 3.35- Superficies de respuesta del jabón para absorción ultravioleta.

Tabla 3.31- Valores de los óptimos obtenidos en el diseño.

JABÓN	ÓPTIMO CALCULADO (°C)
C ₈ K	119
C ₁₀ K	119
C ₁₂ K	114
C ₁₄ K	116
C ₁₆ K	117
C _{18:1} K	120
C ₁₈ K	120

Para dilucidar que óptimo seleccionar para llevar a cabo la reacción (diferentes óptimos), se recurrió, al igual que en fluorescencia, a sumar todos las variables respuesta de todos los tipos de jabón para cada nivel del diseño, obteniéndose sólo una variable respuesta para cada nivel. Una

vez calculada la variable, se volvió a aplicar el mismo diseño de superficie de respuesta. Con lo que, al final, se obtuvo una única gráfica de Pareto, un único valor de R^2 , una única superficie de respuesta y un único óptimo, el cual fue calculado teniendo en cuenta los valores individuales de cada tipo de jabón (*Figura 3.36 y Tabla 3.32*).

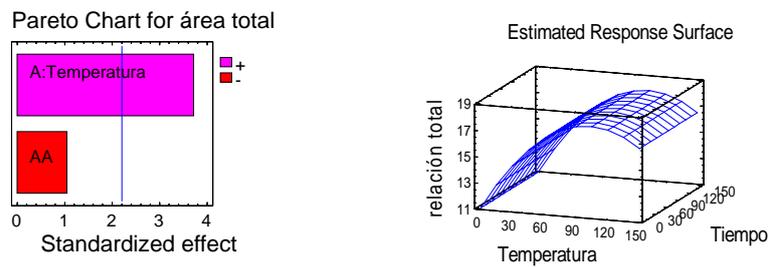


Figura 3.36- Gráfica de Pareto y superficie de respuesta de la relación total para absorción ultravioleta.

Tabla 3.32- Valores del R^2 y óptimo obtenidos en el diseño para la relación total.

JABÓN	R^2 (%)	ÓPTIMO ($^{\circ}$ C)
Relación total	91	118

Por lo tanto, los óptimos para tiempo y temperatura fueron:

Tabla 3.33- Valores óptimos para tiempo y temperatura.

	TIEMPO (MIN.)	TEMPERATURA ($^{\circ}$ C)
Óptimo	5	118

2.4.5 - Optimización volumen de reacción y de la cantidad de reactivos

En este apartado, a diferencia de los demás, existieron diferencias entre lo obtenido en fluorescencia con lo que se observó en absorción por ultravioleta. En ultravioleta no se apreció el cambio de linealidad al cambiar la composición del vial (*Tabla 3.34*). Por lo que no fue necesario añadir agua para mejorar la linealidad. Una composición del vial de inyección del 100% en acetonitrilo era compatible con la obtención de parámetros analíticos de calidad. Por tanto, la cantidad de acetonitrilo a usar dependía, en gran medida, del nivel de preconcentración deseado.

Tabla 3.34- Linealidad para jabón C₁₆K a diferentes composiciones de vial.

Linealidad para cuatro niveles de concentración (R ²)	Composición del vial (% en agua)
0.99	10
0.99	20
0.98	40
0.99	80
0.98	90
0.99	95
0.99	99

Debido a la falta de sensibilidad de la absorción ultravioleta, se intentó preconcentrar al máximo permitido por el microreactor (10 mL). Por lo tanto, se podía evaporar como máximo 10 mL de disolución metanólica de la mezcla de jabón. El volumen de derivación se calculó dependiendo del volumen mínimo necesario, por debajo del cual se perdía analito para ese volumen máximo de volumen de analito a evaporar (10 mL).

Teniendo en cuenta que los reactivos (DAP y éter corona) estaban en un claro exceso estequiométrico, y que estos, por tanto, no tenían influencia en este estudio, se ensayaron diferentes volúmenes de reacción (0.25 mL, 0.50 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL) todos con la misma concentración de DAP (0.5% m/m) y éter corona (0.1% m/m).

Para corregir los diferentes factores de dilución, se añadió diferentes cantidades de acetonitrilo después de la reacción y antes de la inyección hasta que todos los volúmenes ensayados tuvieron la misma concentración cromatográfica ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Para obtener el volumen óptimo, se compararon las áreas para un analito representativo (C_{16}K). A la vista de los resultados obtenidos (*Tabla 3.35*), el volumen óptimo de reacción fue 1 mL, ya que por encima de este valor permanecía constante la señal.

Tabla 3.35- Área de analito a diferentes volúmenes de reacción.

Volumen evaporado de agente derivante (mL)	Área C_{16}K en mAU ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0.25	432
0.5	478
1	560
2	562
5	565

En cuanto a los reactivos, se ensayo la necesidad de añadir éter corona a la reacción. Para ello, se llevó a cabo una reacción sin el reactivo y otra con el reactivo, y se compararon las áreas de todos los analitos (*Tabla 3.36*). Los resultados arrojaron la conclusión de que, la presencia de éter corona, a diferencia de fluorescencia, no era imprescindible, ya que no se observó

alteración en las áreas de los analitos en presencia o ausencia de dicho reactivo. Por lo tanto, para los siguientes estudios, se excluyó el uso del éter corona.

Tabla 3.36- Comparación de las áreas con o sin éter corona.

Analitos	Área 100 mg·L ⁻¹ (mAU). Con éter corona	Área 100 mg·L ⁻¹ (mAU). Sin éter corona
C ₈ K	3180	3162
C ₁₀ K	2119	2135
C ₁₂ K	1735	1745
C ₁₄ K	1292	1278
C ₁₆ K	1040	1057
C _{18:2} K	1679	1655
C _{18:1} K	1029	1025
C ₁₈ K	1375	1345

Excluido la influencia del éter corona y del volumen de reacción, la cantidad de DAP fue la única variable a estudiar. Se estudiaron diferentes porcentajes de DAP (0.01, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0) para un volumen anteriormente optimizado de 1 mL, y para un volumen a evaporar de mezcla de jabón (100 mg·L⁻¹) de 10 mL. Por comparación de las áreas obtenidas, se calculó a qué porcentaje de DAP disminuía la cantidad de analito. Según los resultados (**Tabla 3.37**), el porcentaje de reactivo (DAP) óptimo fue del 0.2% m/m. Cabe destacar que, el óptimo calculado de DAP era 2.5 veces menor al establecido en bibliografía para la misma cantidad de analito.

Del mismo modo, se estudió la cantidad de patrón interno a añadir ($C_{13}K$), teniendo en cuenta que la concentración cromatográfica de patrón interno tendría que ser $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (punto medio del calibrado). Se comprobó que, al añadir 0.5 mL de disolución de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $C_{13}K$ en metanol a los 10 mL de patrón (se esperó que se evaporase parte, ya que la capacidad máxima del vial era de 10 mL), no se observaba cambio alguno en las áreas de los analitos con respecto a la obtenida sin patrón interno, por lo que, esta adición de patrón interno, no repercutía, por incremento de sustancia a derivar, en una pérdida de analito a determinar.

Tabla 3.37- Calculo de la cantidad de reactivo (DAP) a usar.

Porcentaje de DAP (m/m)	Área de $C_{16}K$ a $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (mAU)
0.05	568
0.10	785
0.20	1040
0.5	1044
1	1058

Tabla 3.38- Óptimos obtenidos para volumen de reacción, concentración de reactivo, volumen de analito a evaporar y composición del vial.

VARIABLES	ÓPTIMOS
Volumen de reacción (μL)	500
Concentración de DAP(% m/m)	0.2
Volumen de analito a evaporar (mL)	10
Composición del vial (%)	100 (ACN)

2.4.6 - Estudio de la estabilidad de la reacción de derivación

Según la bibliografía antes mencionada, el agente derivante (DAP) era fotosensible, con lo que la reacción podría degradarse con el tiempo. Debido a este hecho, se realizó un estudio de la estabilidad de la reacción frente al tiempo. Para comprobar este hecho, se derivó una mezcla de jabón de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y se inyectó a varios tiempos (hasta 87 horas). En la siguiente gráfica, se muestran los resultados obtenidos. Se observó como la relación de áreas se mantuvo estable durante todo el tiempo del ensayo (87 horas)

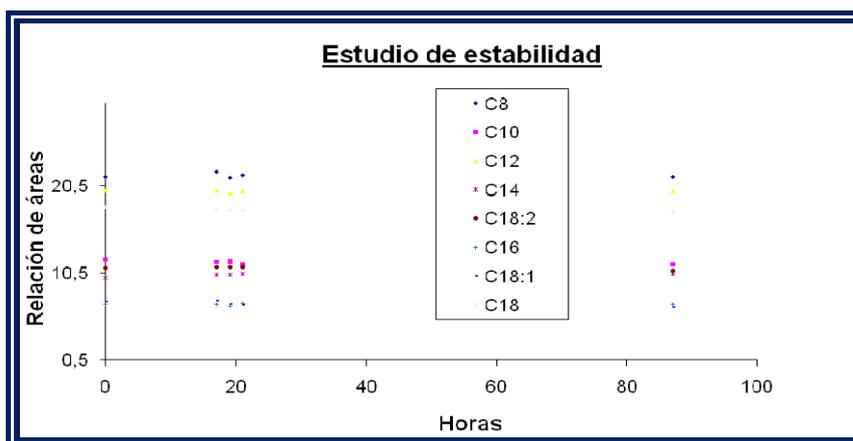


Figura 3.37- Relación de áreas de los analitos derivados frente al tiempo.

2.4.7 - Resumen del protocolo de derivación optimizado

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en este apartado, se resume el protocolo de derivación ya optimizado.

- Añadir, a un microreactor, 10 mL de una disolución metanólica patrón de jabón potásico o muestra a analizar.
- Añadir 0.5 mL de una disolución (100 mg·L⁻¹) de patrón interno (C₁₃K) en metanol.
- Evaporar el volumen (10.5 mL) hasta sequedad con corriente de N₂.
- Añadir 1.0 mL de disolución de DAP (0.2% m/m en acetonitrilo)
- Calentar a 118 °C durante 5 minutos.
- Inyectar en el cromatógrafo de líquidos.

2.4.8 - Prueba de derivación en muestra real

Antes de proceder a una validación de la metodología propuesta, se decidió ensayar tanto el protocolo de derivación como las variables cromatográficas en una muestra real. Para llevar a cabo este ensayo, se siguió el protocolo de tratamiento de la muestra y extracción descrito en bibliografía¹, y al extracto obtenido se le aplicó el protocolo de derivación y la separación cromatográfica optimizados en esta Memoria de Tesis.

La muestra seleccionada para aplicar el ensayo fue lodo de la planta de una EDAR de Estepona, la cual fue tomada después del digestor anaerobio, la muestra fue tomada en diferente época a la usada en fluorescencia, por lo que su composición es diferente.

Las razones por las cuales se seleccionó una muestra de lodo son las mismas que se comentaron en el *Apartado 2.3.10*. El cromatograma obtenido (*Figura 3.38*) demostraba una adecuada separación de los analitos objetos de estudio, por lo que, la metodología propuesta para la

derivación y la separación se adecuaba correctamente a las muestras a analizar durante la presente Memoria.

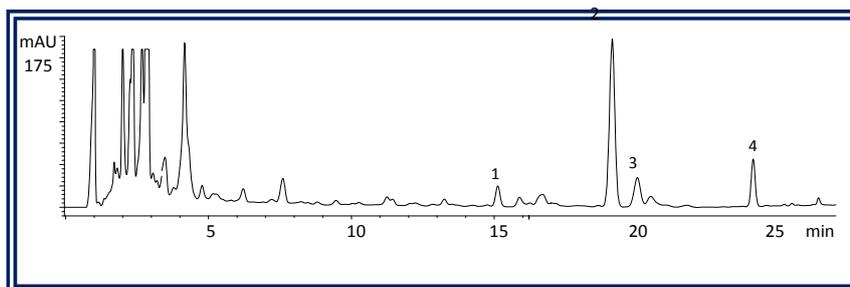


Figura 3.38- *Cromatograma obtenido en muestra real de lodo. Por orden: C₁₄K, C₁₆K, C_{18:1}K, C₁₈K.*

3.- DETERMINACIÓN DEL LAS POR HPLC: OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES

3.1 - Contextualización

El LAS es probablemente el tensioactivo que, desde un punto de vista analítico, más se ha estudiado. Hay, por tanto, decenas de métodos para su determinación, los cuales se estudiaron en la introducción de la presente Memoria. Esta variedad se debe básicamente a la “sencillez” de su determinación, ya que el LAS posee propiedades físicas medibles (absorción por ultravioleta y fluorescencia), por lo tanto, no hace falta llevar a cabo complicados procesos de derivación para su análisis, como en el caso del jabón.

El objetivo de esta memoria, no era tanto establecer una nuevas condiciones cromatográficas, sino modificar algunos parámetros de un

método concreto para adecuarlo a las necesidades de nuestra investigación.

A la hora de elegir un método por cromatografía líquida que se adecuara a las necesidades de nuestra investigación, se tuvieron en cuenta varias premisas: La primera fue la sensibilidad, ya que debido a la variedad y la complejidad de las muestras que se iban a analizar, este parámetro es esencial en la selección del método de partida. La segunda fue la separación cromatográfica. A pesar de que, hasta el momento, no se ha conseguido poner a punto un método por cromatografía líquida capaz de resolver todos los isómeros del LAS, para nuestro estudio, la separación, a parte de la resolución de los homólogos, de los isómeros 2Ø de cada homólogo era de vital importancia, ya que nos daba información acerca de la composición inicial del LAB de partida y de su diferente adsorción en las matrices ambientales analizadas. Finalmente, en tercer lugar, se valoró muy positivamente el hecho de que el método seleccionado se aplicase a muestras ambientales lo más parecidas posible a las matrices objeto de estudio (Lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Basándose en estas premisas, se seleccionó como método de partida el de *Bengoechea y col.*⁷ En la **Tabla 3.39**, se resumen todas las variables cromatográficas. En la **Figura 3.39**, se muestra el cromatograma obtenido tras aplicar las condiciones descritas en la tabla.

⁷ Bengoechea C., Cantarero S. *Analysis of Linear Alkylbenzene Sulfonate in Waste Water and Sludge by High Performance Liquid Chromatography: An Exercise of Validation*. J. Surfact. Deterg 12;21-29, 2009.

Tabla 3.39- Condiciones cromatográficas para la determinación del LAS del método de referencia.

PARÁMETROS	VALOR
Columna	Lichrospher RP-18 250 mm x4.6 mm
Vol. Inyección	100 μ L
Flujo	1.0 mL \cdot min ⁻¹ .
Temperatura	30 °C
Detección (FLD)	$\lambda_{ex.}$ = 232 nm $\lambda_{em.}$ = 290 nm
Eluyentes	Canal A = Agua HPLC con 5 mM trietilamina, 5 mM de ácido acético. Canal B = ACN HPLC
Gradiente	T ₀ = 30% B T ₂₀ = 50% B
Tiempo final	25 min
Ganancia	13 ev

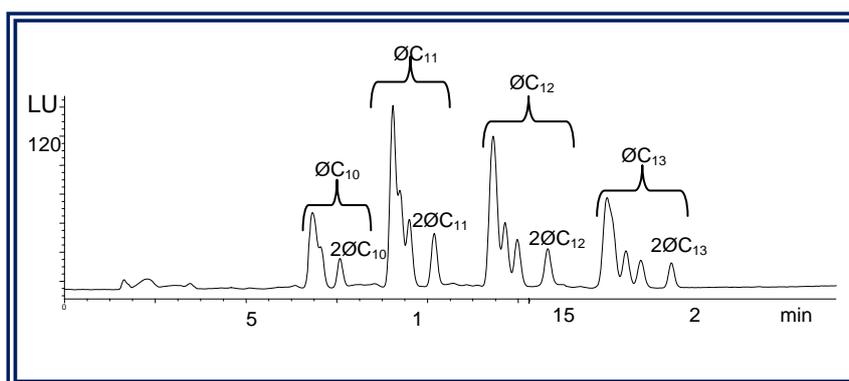


Figura 3.39- Cromatograma obtenido tras aplicar el método propuesto. Mezcla de LAS de 10 mg \cdot L⁻¹.

3.2 - Elección del patrón interno

Para seleccionar el patrón interno, se valoraron tres aspectos: su similitud tanto en estructura como en propiedades físicas y químicas, su resolución cromatográfica con el método propuesto, y su ausencia en el ambiente. Los dos patrones que cumplían ambas premisas fueron el $2\text{ØC}_8\text{-LAS}$ y $2\text{ØC}_{16}\text{-LAS}$. Ambos poseían propiedades parecidas al *LAS* comercial, su resolución con el método era adecuada (**Figura 3.40**), y, al no ser comerciales, no estaban presentes en modo alguno en matrices ambientales.

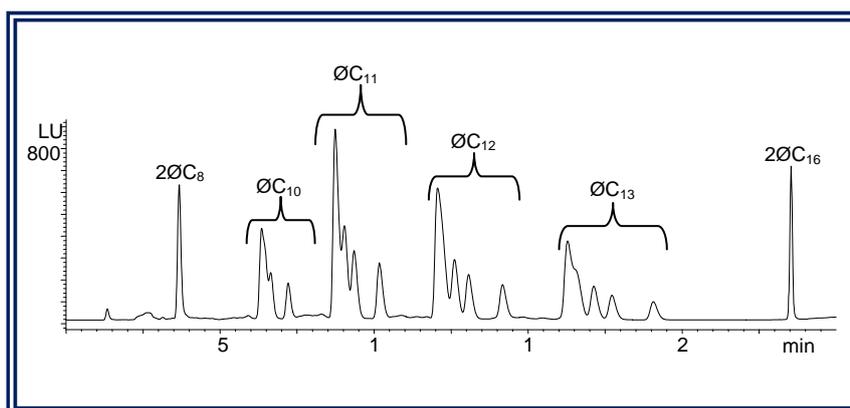


Figura 3.40- Cromatograma obtenido. $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de *LAS*. $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $2\text{ØC}_8\text{-LAS}$ y de $2\text{ØC}_{16}\text{-LAS}$.

Se seleccionó como patrón interno el $2\text{ØC}_8\text{-LAS}$, debido a que se asemejaba más que el $2\text{ØC}_{16}\text{-LAS}$, en longitud de cadena, a la media del *LAS* comercial objeto de estudio. Además, el $2\text{ØC}_8\text{-LAS}$ aparecía a tiempos cortos en el cromatograma (3-4 min), mientras que el $2\text{ØC}_{16}\text{-LAS}$ tenía un tiempo de retención elevado (25 min), con lo que se alargaba el tiempo de análisis. Sin embargo, como más adelante se comentará, el

patrón interno 2OC₁₆-LAS tuvo utilidad en la validación de la metodología analítica.

3.3 - Composición del vial de inyección

La mayoría de metodologías propuestas se basan en un proceso de extracción del LAS con metanol, tras el cual se llevan a cabo procesos de purificación y/o preconcentración con columnas de extracción en fase sólida (SPE). Finalmente, el extracto recogido se inyecta en el cromatógrafo de líquidos (*Introducción, apartado 1.2.5*). A pesar del gran número de publicaciones al respecto, en ninguna se ha estudiado la composición del vial de inyección. En el presente estudio, se detectaron variaciones en la sensibilidad del método si se variaba la composición del vial de inyección.

En gran parte de la bibliografía (*Introducción, apartado 1.2.5*), el disolvente usado para disolver el LAS antes de su inyección cromatográfica es el metanol. En esta Memoria de Tesis, se comprobó que una inyección al 100% de metanol provocaba un acusado descenso en la sensibilidad (más de la mitad) para concentraciones bajas de LAS (<5 mg·L⁻¹). A concentraciones altas, no se detectó este fenómeno.

A la vista de lo ya comentado en este capítulo, se intentó solucionar el problema añadiendo agua en el vial de inyección. Por este motivo, se realizó un ensayo, el cual consistió en ir añadiendo cantidades crecientes de agua al vial de inyección hasta obtener un valor óptimo de porcentaje de agua añadido, por debajo del cual se observaba una pérdida en la señal analítica.

La concentración de partida fue de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de LAS en metanol, a la cual se le añadieron diferentes cantidades de agua hasta un porcentaje determinado (0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 90%). Una vez añadida el agua, se inyectó la disolución en el cromatógrafo, evaluándose el área total de LAS obtenida. Finalmente, se aplicó un factor de corrección, con objeto de tener en cuenta la dilución generada al ir añadiendo agua al vial de reacción.

Según los resultados obtenidos (*Tabla 3.40*), se concluyó que el valor óptimo calculado era del 60% en agua. Por debajo de ese porcentaje en agua, la sensibilidad del LAS disminuía.

A partir de ese momento, como medida de precaución, se aplicó esta dilución a tanto las concentraciones de LAS estudiadas como a las muestras ambientales analizadas.

Tabla 3.40- Relación entre el porcentaje de agua añadido al vial y el área total.

Cantidad de agua añadida (%)	Área de LAS $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (LU)
0	316
10	332
20	358
40	379
60	751
80	752
90	750

Teniendo en cuenta este hecho, a continuación, se resume el protocolo que se llevó a cabo antes de la inyección en el cromatógrafo:

- Añadir, a un microreactor, 1 mL de una disolución metanólica patrón de *LAS-Na* o muestra a analizar.
- Añadir, además, 1 mL de una disolución ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de patrón interno (*2OC₈-LAS*) en metanol.
- Evaporar el volumen (2 mL) hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Añadir 1 mL de disolución de agua/metanol (60:40)
- Inyectar en el cromatógrafo de líquidos.

3.4 - Aplicación en muestra real

Antes de proceder a una validación de la metodología propuesta, se decidió comprobar tanto el método cromatográfico como el protocolo antes de la inyección en una muestra real. Para llevar a cabo este ensayo, se siguió el protocolo de tratamiento de la muestra y extracción descrito en bibliografía (*Introducción, apartado 1.2.5*), al cual se le aplicó el protocolo antes de la inyección y la separación cromatográfica obtenidas en esta Memoria de Tesis.

La muestra seleccionada para aplicar el ensayo fue lodo de una planta EDAR de Estepona, la cual fue tomada después del digestor anaerobio. Las razones por las cuales se seleccionó una muestra de lodo son las mismas que se comentaron en el *Apartado 2.3.10*. El cromatograma obtenido (*Figura 3.41*) demostraba una adecuada separación de los analitos objetos de estudio, por lo que, la metodología propuesta se adecuaba correctamente a las muestras a analizar durante la presente Memoria.

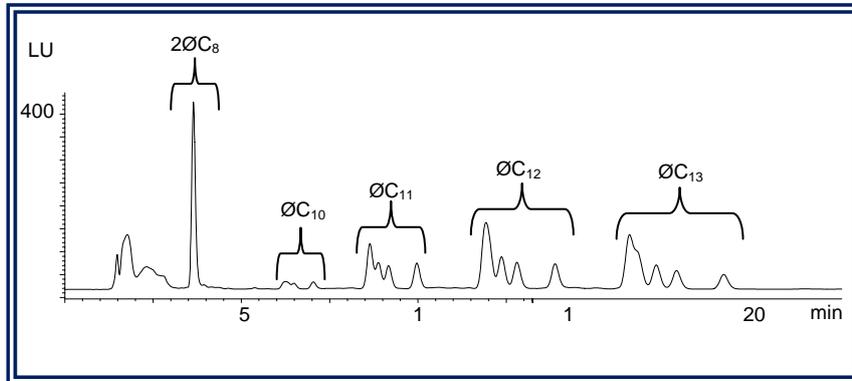


Figura 3.41- Cromatograma obtenido en una muestra real de lodo.

CAPÍTULO 4
TRATAMIENTO DE MUESTRA

1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se presenta la optimización de todas las variables implicadas en el tratamiento de muestras: extracción, reacción y etapa de preconcentración.

En el primer apartado, se desarrolla el tratamiento de muestras para la determinación de jabón en matrices ambientales. Dentro de este apartado, se discute, en primer lugar, los trabajos previos realizados en la misma materia, resaltando las posibles carencias o beneficios que pudieran derivar de la bibliografía existente, las cuales justificaron la puesta a punto de una nueva metodología. A continuación, se desarrolla la metodología aplicada para la optimización de la reacción de extracción con éter de petróleo. El proceso se llevó a cabo para cada matriz (lodos, tierra y sedimentos) y para cada técnica de extracción (Soxhlet, ultrasonidos y microondas). En la tercera parte, se explica la puesta a punto de la reacción de conversión del jabón cálcico a jabón potásico. Para finalizar,

se muestra el procedimiento usado para optimizar la extracción del jabón potásico con metanol para cada matriz y técnica de extracción estudiada.

En el segundo apartado, se desarrolla el tratamiento de muestras para la determinación de LAS en matrices ambientales. De la misma manera que con el jabón, el apartado comienza exponiendo de manera resumida los antecedentes previos, los cuales sirven como base para la justificación de la puesta a punto de una nueva metodología. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la optimización del proceso de extracción con diferentes técnicas (Soxhlet, ultrasonidos, microondas) del analito (LAS) en las diferentes matrices estudiadas (lodos, tierra y sedimentos). Por último, se lleva a cabo un estudio de la idoneidad de añadir un proceso de preconcentración y eliminación de interferentes posterior a la extracción.

2.- TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE JABÓN

2.1 - Antecedentes previos y justificación

Como ya se comentó en capítulos anteriores, existía sólo una metodología que tenía como objetivo la determinación de jabón en matrices ambientales¹. La determinación constaba de varias etapas:

- Extracción Soxhlet con éter de petróleo durante 72 h.
- Reacción de conversión de jabón cálcico a potásico con K_2CO_3 durante 24 horas.

¹ Moreno A., Bravo J., Ferrer J., Bengoechea C. *Soap determination in sewage sludge by HPLC*. SETAC Europe meeting. Postdam, 1992.

- Extracción con metanol durante 24 horas.
- Reacción de derivación con BrMMC y éter corona.
- Inyección en el cromatógrafo de líquidos.

El objeto de la primera etapa era eliminar los posibles interferentes (ácidos grasos libres, lípidos, etc.) que pudieran reaccionar con el agente derivante sin ser jabón. La no eliminación de los interferentes suponía dar un error por exceso en el contenido final de jabón.

A continuación, en la segunda etapa, se llevaba a cabo una reacción de conversión del jabón cálcico a potásico en el extracto sólido. Como se ha comentado en el *Capítulo 1, apartado 2.1.3* el jabón de tipo cálcico (el más abundante en matrices ambientales) es muy insoluble en prácticamente cualquier tipo de disolvente, con lo que su determinación en matrices ambientales requiere de una etapa de conversión del jabón cálcico en otra sustancia que fuera capaz de ser extraída fácilmente. En este caso, se utilizó carbonato potásico (K_2CO_3) y agua como reactivos para dar jabón potásico, el cual es soluble y puede ser extraído con mayor facilidad.

Finalmente, en la tercera etapa del tratamiento de la muestra, se extrae con metanol el jabón potásico generado en la etapa anterior.

Un estudio detenido, en la metodología presentada, reveló ciertos inconvenientes desde un punto de vista analítico:

1. Tiempo de extracción excesivamente largos: 72 horas de extracción con éter de petróleo y 24 horas con metanol eran tiempos

de extracción difícilmente asumibles para cualquier tipo de metodología analítica.

2. Carencia de cualquier tipo de validación: La metodología propuesta no estaba ni optimizaba ni validada en ninguna de sus etapas.

3. Límites de detección y cuantificación elevados: La cantidad de muestra usada (5 g) era muy alta, con lo que, teniendo en cuenta que en ningún momento se llevó a cabo un proceso de preconcentración, los límites de cuantificación y de detección de la metodología eran muy elevados (g de analito/Kg de muestra). Este hecho era una limitación a la hora de determinar muestras con poco contenido en jabón.

Teniendo en cuenta estas razones, se hizo evidente la necesidad de proponer una nueva etapa de tratamiento de muestra.

2.2 - Optimización de las variables implicadas en el proceso de extracción con éter de petróleo

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, fue imprescindible poner a un punto un proceso preliminar de eliminación de interferentes. El objetivo planteado inicialmente fue buscar un disolvente capaz de llevar a cabo este proceso de eliminación en el menor tiempo posible y con el menor gasto de disolvente.

La selección del disolvente estuvo condicionada al cumplimiento de dos premisas:

- Disolver y extraer todo el interferente.
- No disolver ni extraer el analito objeto de estudio (jabón cálcico).

En el método inicial, se propuso una metodología basada en la extracción con éter de petróleo durante 72 horas. El éter de petróleo cumplía ambas premisas. Además de éter de petróleo, se ensayaron otros tipos de disolventes con características parecidas (éter de petróleo, acetato de etilo, ciclohexano, n-hexano y metanol)

Para llevar a cabo dicho estudio se procedió a dopar una cantidad de lodo de EDAR de concentración despreciable de ácidos grasos y de jabón, con cantidades elevadas de ácidos grasos C_8-C_{18} ($100 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Estas cantidades se seleccionaron de acuerdo con el máximo de concentración esperado en cualquier matriz ambiental. Seguidamente, se extrajeron (extracción sólido-líquido) los ácidos durante 72 horas en un Soxhlet, usando como disolvente los anteriormente mencionados. Finalmente, se analizó el extracto líquido, con objeto de cuantificar, en tanto por ciento, cuanto se había extraído de ácidos grasos. El método de derivación usado fue el mismo que el descrito en el capítulo anterior. (*Capítulo 3, apartado 2.1.2*).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 4.1- Porcentaje de extracción de ácidos grasos.

DISOLVENTE	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)
Éter de petróleo	99
Hexano	65
Ciclohexano	71
Acetato de etilo	99
Metanol	98

Se observó como todos los disolventes propuestos eran capaces de extraer, casi cuantitativamente, los ácidos grasos, exceptuando el hexano y el ciclohexano. Este hecho se explicó, debido a la baja polaridad del hexano y ciclo hexano, que dificultaba la extracción de los compuestos grasos más polares (C_8 y C_{10})

Del mismo modo, se dopó cantidades elevadas de jabón cálcico C_8-C_{18} ($50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en un lodo de EDAR con concentración despreciable de jabón, el cual fue sometido al mismo proceso de extracción que para los ácidos grasos. A continuación, se analizó la cantidad residente de jabón en el sólido siguiendo el procedimiento establecido en bibliografía. Para finalizar, se calculó el porcentaje extraído de jabón por cada disolvente.

Según los resultados obtenidos (**Tabla 4.2**) tanto el metanol como el acetato de etilo eran capaces de solubilizar cantidades de jabón pequeñas. Por el contrario, no se detectó este fenómeno ni en el éter de petróleo, ni en el n-hexano, ni tampoco en el ciclohexano.

Tabla 4.2- Porcentaje de extracción de jabón.

DISOLVENTE	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)
Éter de petróleo	0
Hexano	0
Ciclohexano	0
Acetato de etilo	7
Metanol	12

Teniendo en cuenta ambos factores, se concluyó que el éter de petróleo era el disolvente que mejor resultado mostraba, ya que presentaba el máximo posible de extracción de ácidos grasos y el mínimo de jabón. Por lo que, se seleccionó como disolvente de extracción.

Una vez seleccionado el disolvente de extracción, se optimizaron los parámetros instrumentales asociados a las técnicas de extracción. Esta optimización se estructuró con respecto al tipo de muestra ambiental estudiada, ya que cada muestra podía presentar características propias, que podían alterar el proceso de extracción.

2.1.1 - Soxhlet

Las variables implicadas en proceso de extracción Soxhlet son múltiples: la cantidad de muestra, el volumen de disolvente usado para la reacción, la temperatura y el tiempo de extracción.

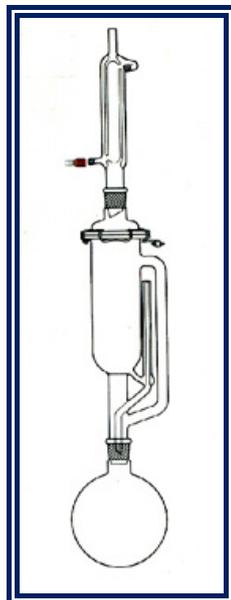


Figura 4.1- Dibujo de un extractor Soxhlet.

La cantidad de muestra, en nuestro caso, no se consideró como variable, ya que se fijó de antemano una cantidad para todos los ensayos de 5 g. La elección de esta cantidad de muestra vino impuesta por las limitaciones de la metodología, debido a que cantidades inferiores a 5 g podían implicar una pérdida de sensibilidad en la metodología. Por otro lado, el uso de cantidades mayores de 5 g repercutía en un consumo de muestra demasiado elevado, teniendo en cuenta que la cantidad disponible de matriz era limitada. Por lo tanto, se optó, como solución de compromiso, establecer una cantidad de 5 g para todos los ensayos.

En cuanto al volumen de disolvente usado, en el caso del Soxhlet dependía del tamaño del Soxhlet. Para el tipo y cantidad de muestra seleccionada, el tamaño recomendable para llevar a cabo la extracciones fue de 250 mL¹.

La temperatura de extracción, en el caso del Soxhlet, es de difícil control, ya que no poseía panel de control de la misma. La única forma de controlar la temperatura fue a través de un termómetro externo. Para la selección de la temperatura de trabajo, se tuvo en cuenta que cualquier temperatura superior al punto de ebullición del éter de petróleo (40 °C-50 °C) podía considerarse adecuada para su extracción. Sin embargo, el uso de una temperatura muy superior al punto de ebullición provocaba un aumento de la presión, con el consiguiente incremento en la posibilidad de fugas de disolvente. Tomando en consideración ambos factores, se optó por seleccionar la temperatura de 70 °C como solución de compromiso.

Por tanto, el tiempo de extracción fue la única variable susceptible de ser optimizada. El óptimo se calculó mediante un ensayo a diferentes tiempos de extracción (6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h). Para llevar a cabo el ensayo, se seleccionó una muestra para cada tipo de matriz (tierra, lodo de EDAR y sedimentos) con bajo contenido en ácidos grasos, la cual se dopó con una cantidad elevada de mezcla de ácidos grasos ($100 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$). El tiempo óptimo se calculó de acuerdo con el máximo porcentaje de extracción de ácidos grasos con el menor tiempo de extracción posible.

En la **Tabla 4.3**, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.3- Optimización del tiempo de extracción éter de petróleo.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (h)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
6	75	52	78
12	98	98	99
24	98	97	95
48	99	98	97
72	97	95	99

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 12 h.

2.1.2 - Ultrasonidos

Para la optimización de la variables implicadas en el proceso de extracción con un sistema de ultrasonidos, se optó por el diseño propuesto para el LAS². La selección de este diseño se debió a la similitud del analito objeto de estudio (tensoactivos).

En la **Figura 4.2**, se muestra un esquema gráfico sobre el proceso de extracción con ultrasonidos.

² Nimer M. *Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) en una parcela agrícola de la Vega de Granada*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2007.

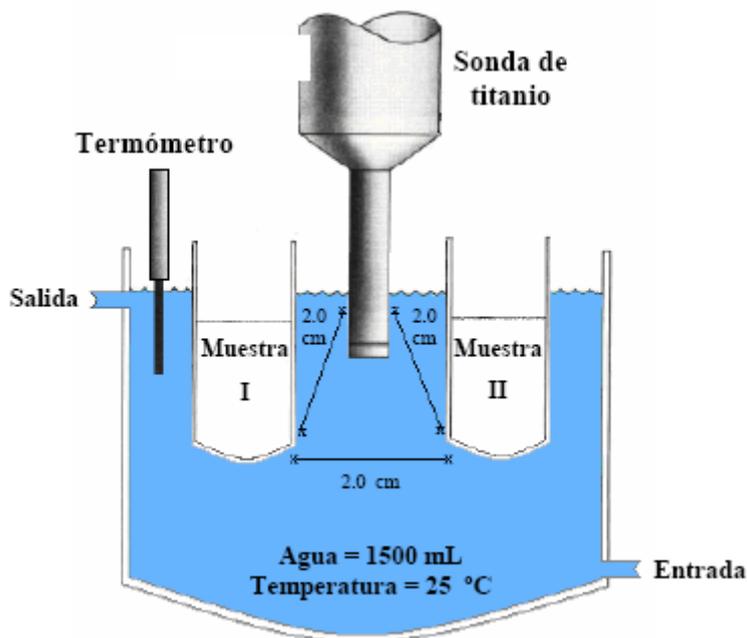


Figura 4.2- Esquema sobre el proceso de extracción por ultrasonidos.

Teniendo en cuenta las características del equipo, las variables susceptibles de ser optimizadas fueron: la cantidad de muestra, amplitud, volumen de disolvente y tiempo de extracción.

La cantidad de muestra seleccionada, por los motivos anteriormente expuestos, fue de 5 g.

La selección del volumen de disolvente se relacionó con la capacidad del frasco (70 mL) y la cantidad de muestra (5 g). Por lo que el volumen se calculó de acuerdo con el menor volumen posible capaz de disolver la muestra, formando una disolución homogénea. En este caso, se

comprobó que el volumen mínimo para formar una mezcla líquida con la matriz fue de 50 mL.

Por lo tanto, las dos únicas variables que se optimizaron fueron la amplitud y el tiempo de extracción. La amplitud está directamente relacionada con la potencia de la sonda, pudiéndose controlar en tanto por ciento, es decir, un 75% de amplitud correspondía a usar el 75% de la potencia total del equipo.

Para la optimización de estas dos variables, se recurrió, a un diseño experimental en superficie de respuesta (DSR), en concreto un diseño cúbico ortogonal centrado en el cuerpo. Las características de este diseño y su posterior análisis se ha descrito en el *Capítulo 3, apartado 2.3.5* de la presente memoria de Tesis. Los valores máximo y mínimo para cada variable fueron seleccionados de acuerdo con las posibilidades del sistema. Una amplitud superior al 75% podría acortar la vida de la sonda. Del mismo modo, tiempos de extracción superiores a 20 minutos no son recomendables, debido a un posible sobrecalentamiento del sistema. El diseño de superficie de respuesta utilizado se resume en la siguiente tabla:

Tabla 4.4- Diseño experimental.

TIEMPO DE EXTRACCIÓN (min)	AMPLITUD (%)
5.0	25
12.5	50
20.0	75
5.0	25
12.5	50
20	75
5.0	25
12.5	50
20	75

Los resultados del diseño, por tipo de muestra, se muestran a continuación. Como variable respuesta, se utilizó el porcentaje de extracción de una mezcla de ácidos grasos ($100 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) dopada en diferentes muestras (tierra, sedimentos y lodos).

➤ *Tierra*

De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

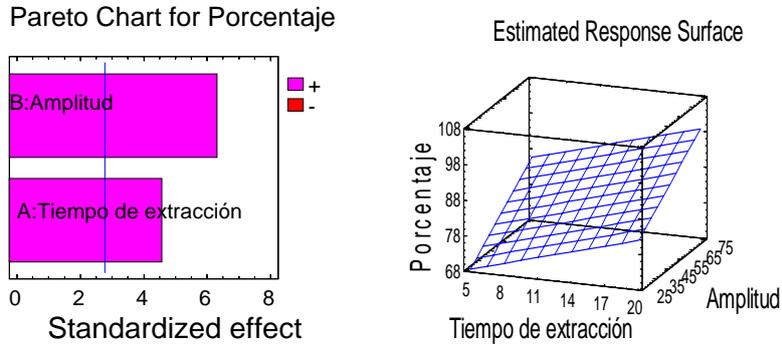


Figura 4.3- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.5- Resultados obtenidos para la optimización por ultrasonidos.

R^2 (%)	Óptimo T. extracción (min)	Óptimo Amplitud (%)
94	20	75

➤ *Lodos de EDAR*

A la vista de los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

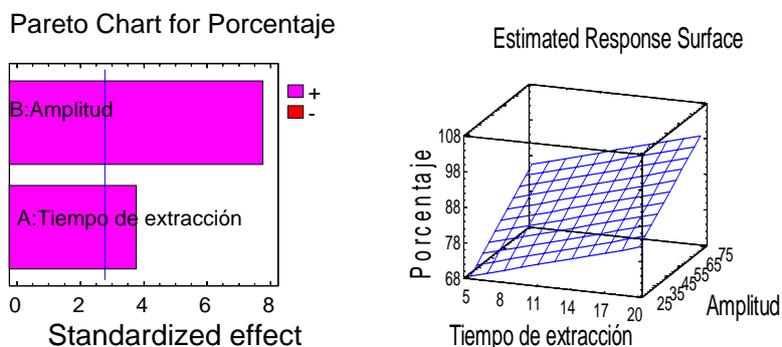


Figura 4.4- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.6- Resultados obtenidos para la optimización.

R ² (%)	Óptimo T. extracción (min)	Óptimo Amplitud (%)
91	20	75

➤ Sedimentos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R² calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

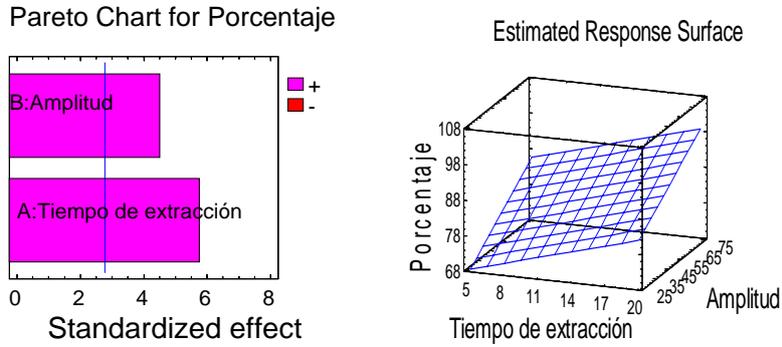


Figura 4.5- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.7- Resultados obtenidos para la optimización.

R^2 (%)	Óptimo T. extracción (min)	Óptimo Amplitud (%)
90	20	75

2.1.3 - Microondas

Al igual que en las demás técnicas de extracción, las variables en el proceso de extracción para el microondas son múltiples: cantidad de muestra, volumen de extracción, temperatura, potencia, presión y tiempo de extracción.



Figura 4.6- Equipo de microondas.

La cantidad de muestra se mantuvo fija (5 g) por las mismas razones anteriormente expuestas. Del mismo modo, se mantuvo a 1600 W (máxima posible), ya que a la hora de extraer las muestras, siempre se optaba por tratar el número máximo de muestras posible (14).

Si tenemos en cuenta las características propias del sistema de extracción acelerada por microondas, la temperatura, volumen y la presión estaban directamente relacionadas, debido a que un aumento de temperatura y del volumen derivaba en un aumento de la presión. Por el mismo motivo que el ya comentado en ultrasonidos, se seleccionó un volumen de extracción de 50 mL. En cuanto a la temperatura, durante el proceso de extracción, debía ser siempre mayor al punto de ebullición del disolvente usado. Sin embargo, un excesivo aumento de la temperatura daba lugar a presiones muy elevadas (100 bares), provocando fugas en el sistema y el inmediato bloqueo del equipo. Por lo tanto, teniendo en cuenta este factor, se optó

por controlar la presión. Se seleccionó el máximo valor de la presión, por encima del cual se producía riesgo de fuga o escape. El óptimo fue de 70 bares. Del tal modo que, el instrumento aumentaba la temperatura de extracción hasta llegar a una presión límite de 70 bares, una vez alcanzada esa presión, tanto la temperatura como la propia presión se mantenían constantes durante el resto del proceso de extracción.

Por lo tanto, la única variable a optimizar fue el tiempo de extracción. El tiempo total de extracción consta de varias etapas: tiempo de acondicionamiento, tiempo de extracción y tiempo de enfriamiento.

El tiempo de acondicionamiento se definía como el tiempo necesario para que el sistema alcance las condiciones de extracción, en nuestro caso, es el tiempo que tardaba el sistema en alcanzar los 70 bares de presión. Suele estar comprendido entre 5 y 10 minutos. En el caso objeto de estudio fue de 10 minutos.

El tiempo de enfriamiento era el tiempo usado por el instrumento para restablecer las condiciones ambientales iniciales (temperatura y presión en el laboratorio). Este proceso duraba 25 minutos.

Finalmente, el tiempo de extracción era el tiempo consumido, una vez alcanzada las condiciones de extracción (70 bares), en el que se mantenía en contacto la disolución y la muestra para que se llevase a cabo la extracción. Esta variable era susceptible de ser optimizada.

Para la optimización del tiempo de extracción, se realizó un ensayo en el que se estudiaron diferentes tiempos de extracción (5, 10, 15, 20 y 25 minutos) de ácidos grasos dopados ($100 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en diferentes muestras

ambientales (tierra, lodos y sedimentos). El valor óptimo se determinó en función del mayor porcentaje de extracción en el menor tiempo posible.

En la *Tabla 4.8*, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.8- Optimización del tiempo de extracción éter de petróleo.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (min)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
5	55	50	57
10	73	69	76
15	97	96	99
20	97	99	98
25	99	98	97

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 15 min.

2.1.4 - Conclusiones

A la vista de todos los resultados obtenidos, se concluyó, desde el punto de vista de la extracción de los ácidos grasos, que no existían diferencias significativas en el tipo de muestra. A continuación, se resumen las variables óptimas usadas para cada sistema de extracción.

➤ Soxhlet

Tabla 4.9- Variables optimizadas para la extracción con éter de petróleo.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	250
Temperatura (°C)	70
Tiempo de extracción (h)	12

➤ Ultrasonidos

Tabla 4.10- Variables optimizadas para la extracción con éter de petróleo.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Amplitud (%)	75
Tiempo de extracción (min)	20

➤ *Microondas***Tabla 4.11- Variables optimizadas para la extracción con éter de petróleo.**

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Presión (bares)	70
Potencia (W)	1600
Tiempo de acon. (min)	10
Tiempo de extracción (min)	15
Tiempo de enfri. (min)	25

2.3 - Optimización de las variables implicadas en el proceso de conversión de jabón cálcico a jabón potásico

Como se ha explicado en los apartados anteriores, para el análisis de jabón precipitado (cálcico) se requería la conversión del mismo, debido a su poca solubilidad, en otra sustancia lo más similar posible que fuera fácilmente extraíble.

A la hora de seleccionar en que compuesto transformar el jabón cálcico, se pensó, obviamente, en convertir el jabón cálcico en otras sales de ácidos grasos más solubles. Dentro de estas sales, las más frecuentes son las sódicas y potásicas. Para dilucidar cuál seleccionar, se tuvo en cuenta la solubilidad, siendo las sales potásicas más solubles que las sódicas.

Para convertir el jabón cálcico en potásico, se optó por añadir ácido trietilendiaminotetraacético tripotásico (EDTA-3K) y carbonato potásico.

El EDTA-3K poseía la estructura apropiada para formar un complejo con el calcio, liberando el ácido graso proveniente del jabón, el cual, en una última etapa, reaccionaba con el carbonato potásico para dar jabón potásico. En la **Figura 4.7**, se muestra de manera esquemática el proceso de conversión. Las dos partes de la reacción (reacción de complejación y posterior transformación a jabón potásico) se llevaban a cabo en una misma etapa, es decir, se añadían a la vez tanto el EDTA-3K como el carbonato potásico a la muestra que contenía jabón cálcico.

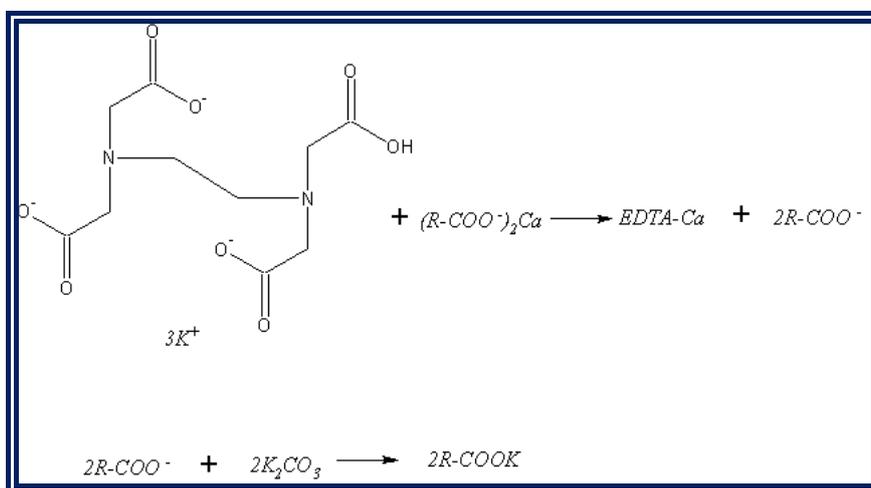


Figura 4.7- Reacción de transformación de jabón cálcico a potásico.

El medio de la reacción fue agua, ya que tanto el carbonato como el EDTA son sales solubles en agua. La reacción de transformación consistió, por lo tanto, en disolver una cantidad de EDTA y carbonato a optimizar en agua, vertiendo, con posterioridad, la disolución resultante en 5 g de muestra ambiental, previamente extraída con éter de petróleo. Finalmente, para que se llevase a cabo la reacción de manera adecuada, se agitó y se calentó la mezcla resultante durante un tiempo determinado.

Teniendo en cuenta los diferentes procesos asociados a la reacción de transformación, varias son las variables a optimizar: cantidad de reactivos (EDTA y carbonato), volumen de agua, temperatura y tiempo de reacción.

Para optimizar el tiempo y la temperatura, se tuvo en cuenta que algunos tipos de jabón (los de cadena más larga) eran parcialmente solubles en agua, por lo que la utilidad del agua se restringía únicamente como medio de reacción, no como disolvente de extracción. Por lo tanto, era necesario un proceso de evaporación del agua después de que se llevase a cabo la reacción, para favorecer la extracción posterior en un disolvente más apropiado.

La necesidad de un proceso de eliminación del agua influía en la elección del tiempo y temperatura de reacción. Teniendo en cuenta este hecho se optó por elegir una temperatura de reacción de 105 °C, la cual era superior al punto de ebullición del agua, y un tiempo de reacción de varias horas, tiempo necesario para que se evaporase el disolvente. Estas condiciones eran suficientes para que la reacción se diera, ya que basándonos en la bibliografía¹, la reacción de transformación era relativamente rápida (aprox. 30min).

Del mismo modo, el volumen de agua usado para llevar a cabo la reacción fue el mínimo permitido para formar una mezcla homogénea con todos los reactivos y la muestra, debido a que luego debía evaporarse. Por tanto, el volumen de agua seleccionado fue de 50 mL.

Para optimizar las cantidades de reactivos (EDTA y carbonato), se recurrió a un diseño experimental cúbico ortogonal centrado en el cuerpo. Las características de este diseño y su posterior análisis se

comentaron en el *Capítulo 3, apartado 2.3.5* de la presente Memoria de Tesis. Los valores máximos y mínimos de cada variable se seleccionaron de acuerdo con la estequiometría de la reacción. El ensayo consistió en dopar 5 g de cada matriz ambiental (tierra, lodos de EDAR y sedimentos) con una cantidad elevada de mezcla de jabón cálcico ($50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). A continuación, a la muestra se le aplicó el proceso de extracción con éter de petróleo optimizado, y se llevó a cabo la reacción de transformación con cantidades variables de reactivos, fijando el volumen de reacción (50 mL), temperatura de reacción $105 \text{ }^\circ\text{C}$ y tiempo de reacción (4 h). A continuación, se extrajo el jabón potásico generado siguiendo el método de referencia, el cual consistió en una extracción Soxhlet durante 24 h. Finalmente, el jabón obtenido se calculó mediante derivación y análisis por HPLC con el método propuesto en capítulos anteriores. La variable respuesta usada fue el porcentaje de conversión de jabón cálcico. En la tabla siguiente (*Tabla 4.12*), se resume los valores usados para el diseño experimental.

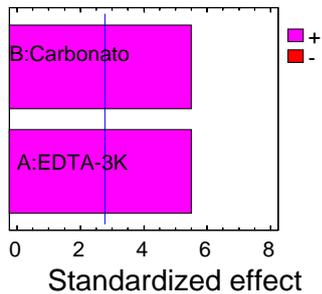
Tabla 4.12- Diseño experimental. EDTA y K_2CO_3 .

CANTIDAD DE EDTA-3K (mg)	CANTIDAD DE K_2CO_3 (mg)
25	25
50	50
75	75
25	25
50	50
75	75
25	25
50	50
75	75

➤ Tierra

De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. Los valores óptimos se muestran a continuación.

Pareto Chart for Porcentaje



Estimated Response Surface

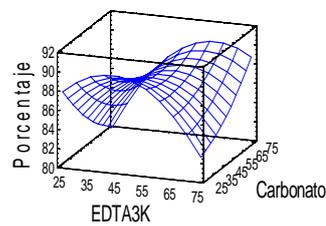


Figura 4.8- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

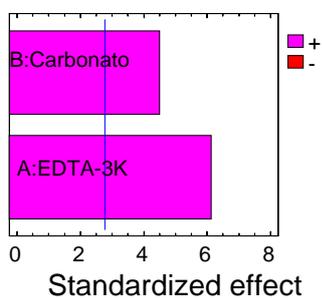
Tabla 4.13- Resultados obtenidos para la optimización.

R^2 (%)	CANTIDAD DE EDTA-3K (mg)	CANTIDAD DE CARBONATO (mg)
90	50	25

➤ *Lodos de EDAR*

De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. Los valores óptimos se muestran a continuación.

Pareto Chart for Porcentaje



Estimated Response Surface

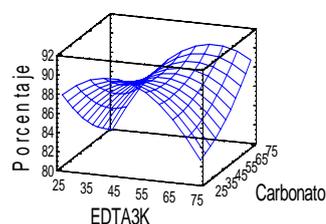


Figura 4.9- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.14- Resultados obtenidos para la optimización.

R^2 (%)	CANTIDAD DE EDTA-3K (mg)	CANTIDAD DE CARBONATO (mg)
93	50	25

➤ *Sedimentos*

De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. Los valores óptimos se muestran a continuación

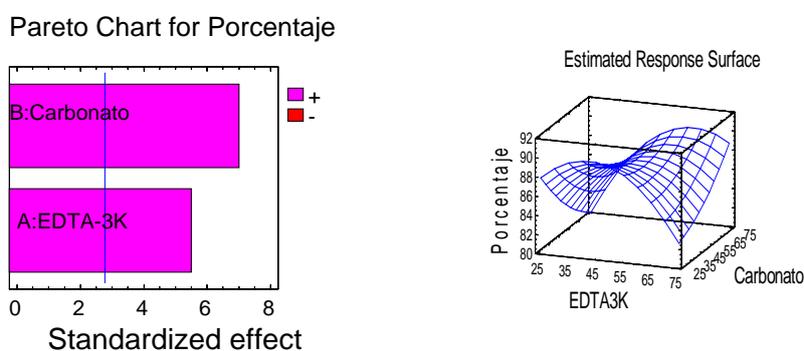


Figura 4.10- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.15- Resultados obtenidos para la optimización.

R^2 (%)	CANTIDAD DE EDTA-3K (mg)	CANTIDAD DE CARBONATO (mg)
96	50	25

Los resultados mostraron que no había casi diferencia en el tipo de matriz usado, siendo los valores muy próximos. En la tabla que viene a continuación (*Tabla 4.16*), se resumen los resultados óptimos obtenidos para la reacción de conversión de jabón cálcico a potásico.

Tabla 4.16- Variables optimizadas para la reacción de transformación.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de agua (mL)	50
Temperatura (°C)	105
Tiempo de reacción (h)	4
Cantidad de EDTA-3K (mg)	50
Cantidad de K ₂ CO ₃	25

2.4 - Optimización de las variables implicadas en el proceso de extracción del jabón potásico

La última etapa del tratamiento de muestra consistió en una extracción del jabón potásico generado tras su conversión a partir del jabón cálcico.

De la misma manera que para la primera extracción con éter de petróleo, se planteó como objetivo la selección del disolvente adecuado para llevar a cabo el proceso de extracción del jabón potásico.

En el método inicial, se proponía una metodología basada en la extracción con metanol durante 24 horas. Además del metanol, se ensayaron otros tipos de disolventes con características parecidas (acetato de etilo, acetona, agua y éter de petróleo).

Para comprobar que disolvente se adecuaba mejor a las premisas establecidas, se llevó a cabo un ensayo. El ensayo consistió en dopar una cantidad de lodo de EDAR, de concentración despreciable de ácidos grasos y de jabón, con cantidades elevadas de una mezcla de jabón C₈-C₁₈

(50 g·Kg⁻¹). Estas cantidades se seleccionaron de acuerdo con el máximo de concentración esperado en cualquier matriz ambiental. Seguidamente, se procedió a aplicar las etapas del tratamiento de muestra ya optimizado (extracción con éter de petróleo y reacción de conversión de jabón cálcico a potásico). Finalmente, de acuerdo con el método propuesto, se extrajo (extracción sólido-líquido) el jabón potásico generado durante 24 horas en un Soxhlet, usando como disolvente los anteriormente mencionados. Finalmente, se analizó el extracto líquido, con objeto de cuantificar, en tanto por ciento, cuanto se había extraído de jabón potásico. El método de derivación usado fue el mismo que en el capítulo anterior (*Capítulo 3, apartado 2.1.2*).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 4.17- Porcentaje de extracción de jabón potásico.

DISOLVENTE	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)
Éter de petróleo	75
Agua	90
Acetona	85
Acetato de etilo	87
Metanol	92

Se observó, como todos los disolventes propuestos eran capaces de extraer los analitos en mayor o menor medida dependiendo de su polaridad, siendo los compuestos más polares (agua y metanol) los que mejores porcentajes de extracción presentaban. Este hecho se explicó, debido a la alta solubilidad que presentan por las sales potásicas de los ácidos grasos

en compuestos polares. Sin embargo, como ya se indicó, el jabón de cadena lineal más larga (C₁₆ y C₁₈) presentaba, a pesar de ser una sal, peor tendencia a solubilizarse en medios muy polares como el agua. Por el contrario, disolventes con menor carácter polar y orgánico como metanol, poseían las características ideales para extraer, de manera casi cuantitativa, todo el jabón potásico presente independientemente de la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Una vez seleccionado el disolvente de extracción (metanol), se optimizaron los parámetros instrumentales asociados a las técnicas de extracción. Esta optimización, al igual que para la extracción con éter de petróleo, se estructuró con respecto al tipo de matriz ambiental estudiada, ya que cada matriz podía presentar características propias del tipo de muestra, que podían alterar el proceso de extracción.

2.4.1 - Soxhlet

Como ya se ha comentado, las variables implicadas en proceso de extracción Soxhlet son múltiples: cantidad de muestras, volumen de disolvente, temperatura y tiempo.

Por las mismas razones comentadas en el *Apartado 2.2.1* de este Capítulo, la única variable a optimizar fue el tiempo de extracción.

El óptimo se calculó mediante un ensayo a diferentes tiempos de extracción (4 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h). Para llevar a cabo el ensayo, se seleccionó una muestra para cada tipo de matriz (tierra, lodo de EDAR y sedimentos) con bajo contenido en jabón, la cual se dopó con una cantidad elevada de mezcla de jabón cálcico (50 g·Kg⁻¹). A continuación, se le

aplica a la muestra el tratamiento de muestra anteriormente mencionado y ya optimizado. El tiempo óptimo se calculó de acuerdo con el máximo porcentaje de extracción de jabón con el menor tiempo de extracción posible.

El ensayo se realizó a las tres matrices estudiadas (tierra, lodo y sedimentos).

En la **Tabla 4.18**, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.18- Optimización del tiempo de extracción metanol.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (h)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
4	80	62	68
6	95	89	89
12	90	90	85
24	93	91	91
48	92	87	90

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 6 h.

2.4.2 - Ultrasonidos

Para un equipo de ultrasonidos, las variables susceptibles de ser optimizadas fueron: cantidad de muestra, amplitud, volumen de disolvente y tiempo de extracción.

De igual manera que en el *Apartado 2.2.2* de este capítulo, las variables a optimizar se redujeron a la amplitud y al tiempo de extracción. Para su optimización, se planteó el mismo diseño experimental que para la extracción con éter de petróleo.

Los resultados del diseño, por tipo de muestra, se muestran a continuación, como variable respuesta, se utilizó el porcentaje de extracción de una de jabón cálcico ($50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) dopada en diferentes matrices (tierra, sedimentos y lodos).

➤ *Tierra*

De acuerdo con los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

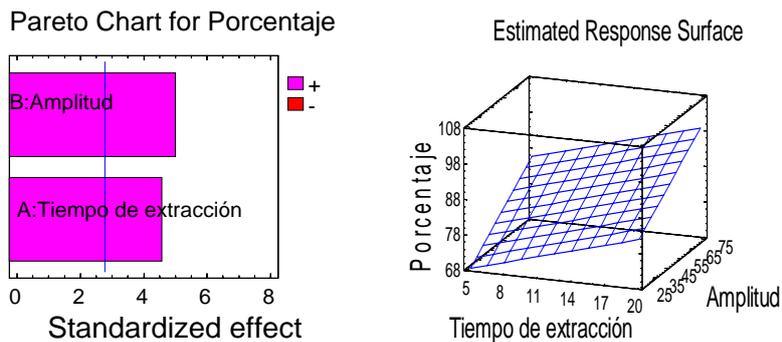


Figura 4.11- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.19- Resultados obtenidos para la optimización.

R² (%)	ÓPTIMO T. EXTRACCIÓN (min)	ÓPTIMO AMPLITUD (%)
89	20	75

➤ *Lodos de EDAR*

A la vista de los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R² calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

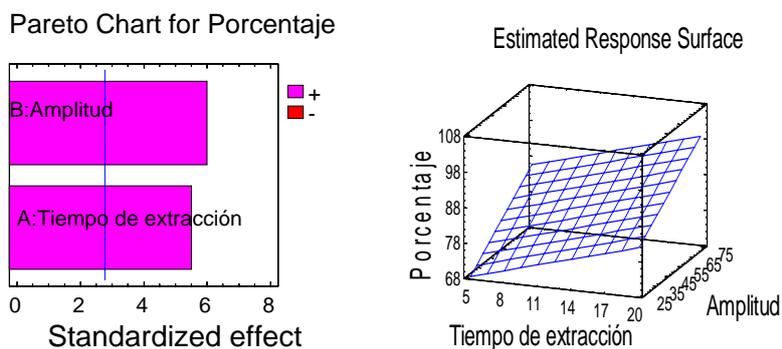


Figura 4.12- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.20- Resultados obtenidos para la optimización.

R² (%)	ÓPTIMO T. EXTRACCIÓN (min)	ÓPTIMO AMPLITUD (%)
87	20	75

➤ *Sedimentos*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, ambas variables estudiadas, según el gráfico de Pareto, son significativas. El valor de R^2 calculado fue muy elevado, demostrando la idoneidad del modelo seleccionado. El valor óptimo calculado para cada variable fue el máximo permitido por el sistema.

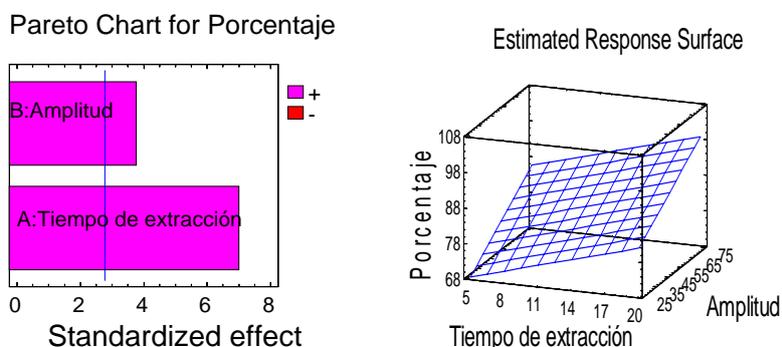


Figura 4.13- Gráfico de Pareto y superficie de respuesta.

Tabla 4.21- Resultados obtenidos para la optimización.

R^2 (%)	ÓPTIMO T. EXTRACCIÓN (min)	ÓPTIMO AMPLITUD (%)
93	20	75

2.4.3 - Microondas

Las variables en el proceso de extracción para el microondas, como ya se ha comentado, son múltiples: cantidad de muestra, volumen de extracción, temperatura, potencia, presión y tiempo de extracción.

Siguiendo un razonamiento similar al dado en el *Apartado 2.2.3* de este capítulo, la única variable susceptible de ser optimizada es el tiempo de extracción.

Para la optimización del tiempo de extracción, se realizó un ensayo en el que se estudiaron diferentes tiempos de extracción (5, 10, 15, 20 y 25 min) de mezcla de jabón ($50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en diferentes muestras ambientales (tierra, lodos y sedimentos). El valor óptimo, se determinó en función del mayor porcentaje de extracción en el menor tiempo posible.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

En la *Tabla 4.22*, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.22- Optimización del tiempo de extracción metanol.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (min)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
5	67	52	66
10	92	88	92
15	88	91	91
20	89	87	89
25	91	89	85

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 10 min.

2.4.4 - Conclusiones

A la vista de todos los resultados obtenidos, se concluyó, que desde el punto de vista de la extracción del jabón potásico, no existían diferencias significativas con respecto al tipo de matriz. A continuación, se resumen las variables óptimas usadas para cada sistema de extracción.

➤ *Soxhlet*

Tabla 4.23- Variables optimizadas para la extracción de jabón.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	250
Temperatura (°C)	100
Tiempo de extracción (h)	6

➤ *Ultrasonidos*

Tabla 4.24- Variables optimizadas para la extracción de jabón.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Amplitud (%)	75
Tiempo de extracción (min)	20

➤ *Microondas(MAE)*

Tabla 4.25- Variables optimizadas para la extracción de jabón.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Presión (bares)	70
Potencia (W)	1600
Tiempo de acon. (min)	10
Tiempo de extracción (min)	10
Tiempo de enfri. (min)	25

2.4.5 - Estudio de la etapa de centrifugación

En este apartado, se estudió la aplicación de una etapa de centrifugación posterior a la extracción.

Para el caso del microondas y el Soxhlet no fue necesario el uso de un proceso de centrifugación, ya que el extracto obtenido después de cada extracción no presentaba partículas que pudieran impedir su correcta derivación y posterior análisis. En cambio, para el caso de los ultrasonidos, después de la etapa de extracción del jabón potásico generado, presentaba una mezcla homogénea entre la disolución y la matriz dopada, por lo que fue requerida una etapa de centrifugación. Sin embargo, en el proceso de extracción con éter de petróleo no se daba este hecho, ya que se observaba la perfecta separación entre fases.

Para optimizar el proceso de centrifugación, se realizó un ensayo a diferentes tiempos y revoluciones por minuto en una centrífuga. Se ensayaron tres diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) a dos diferentes potencias (2000 rpm y 4000 rpm). El ensayo que mostró una mejor separación entre el sólido y el líquido a un tiempo y potencia menor fue 10 minutos y 4000 rpm, siendo, por tanto, los valores usados para los análisis posteriores.

2.4.6 - Resumen del tratamiento de muestra para la determinación de jabón en matrices ambientales

En este apartado, se muestran las etapas del tratamiento de muestra para cada técnica de extracción estudiada (Soxhlet, ultrasonidos y microondas). Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias significativas entre el tipo de matriz (tierra, lodos y sedimentos), el protocolo que se presenta a continuación para cada técnica fue aplicado a todas las matrices de manera general.

➤ Soxhlet

Tabla 4.26- Variables optimizadas para el tratamiento de muestra.

<i>Extracción con éter de petróleo</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	250
Temperatura (°C)	70
Tiempo (h)	12
<i>Reacción de conversión</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Temperatura (°C)	105
Tiempo (h)	4
Cantidad de EDTA-3K (mg)	50
Cantidad de K ₂ CO ₃ (mg)	25
<i>Extracción con metanol</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	250
Temperatura (°C)	100
Tiempo de extracción (h)	6

➤ *Ultrasonidos*

Tabla 4.27- Variables optimizadas para el tratamiento de muestra.

<i>Extracción con éter de petróleo</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Amplitud (%)	75
Tiempo (min)	20
<i>Reacción de conversión</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Temperatura (°C)	105
Tiempo (h)	4
Cantidad de EDTA-3K (mg)	50
Cantidad de K ₂ CO ₃ (mg)	25
<i>Extracción con metanol</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Amplitud (%)	75
Tiempo de extracción (min)	20

➤ *Microondas***Tabla 4.28- Variables optimizadas para el tratamiento de muestra.**

<i>Extracción con éter de petróleo</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Presión (bares)	70
Potencia (W)	1600
Tiempo de acon. (min)	10
Tiempo de extracción (min)	15
Tiempo de enfri. (min)	25
<i>Reacción de conversión</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Temperatura (°C)	105
Tiempo (h)	4
Cantidad de EDTA-3K (mg)	50
Cantidad de K ₂ CO ₃ (mg)	25
<i>Extracción con metanol</i>	
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Presión (bares)	70
Potencia (W)	1600
Tiempo de acon. (min)	10
Tiempo de extracción (min)	10
Tiempo de enfri. (min)	25

3.- TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS

3.1 - Antecedentes previos y justificación

De acuerdo con la bibliografía estudiada (*Capítulo 1, apartado 2.5.1*), existen multitud de metodologías para la determinación del LAS en matrices ambientales. Se han desarrollado metodologías tanto para Soxhlet como ultrasonidos pasando, las más recientes, por el uso del microondas o de líquidos presurizados.

La razones que explican esta amplia variedad de metodologías son fundamentalmente dos: a) La relevante importancia a nivel industrial del LAS; b) Su fácil determinación analítica (posee fluorescencia nativa).

Basándonos en todo estos antecedentes previos, en la presente Memoria de Tesis, se propone un estudio comparativo de diferentes técnicas de extracción (Soxhlet, microondas y ultrasonidos), aplicado a varias matrices ambientales (lodos de EDAR, tierra y sedimentos). Teniendo en cuenta la bibliografía, no existe un estudio conjunto previo para estas técnicas de extracción y esta variedad de matrices.

3.2 - Optimización de las variables implicadas en el proceso de extracción

La determinación del *LAS* presentaba la ventaja, con respecto al jabón, de la ausencia de un tratamiento de extracción previo de la matriz para la eliminación de interferentes.

El primer objetivo fue la selección del disolvente para llevar a cabo la extracción. Teniendo en cuenta los trabajos previos, se ensayaron cinco disolventes de extracción: acetato de etilo, acetona, agua, éter de petróleo y metanol.

Para comprobar qué disolvente presentaba mayor capacidad de extracción, se llevó a cabo el siguiente procedimiento: dopar a una cantidad de lodo de EDAR, con concentración despreciable de *LAS*, con cantidades elevadas de mezcla de *LAS* comercial ($25 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Estas cantidades se seleccionaron de acuerdo con el máximo de concentración esperado en cualquier muestra ambiental. Los lodos, debido a su naturaleza y composición son las matrices que presentan una mayor problemática a la hora de la extracción, por lo que los resultados de extracción obtenidos son más representativos. A continuación, de acuerdo con la bibliografía existente, se extrajo (extracción sólido-líquido) el *LAS* presente en la muestra durante 24 horas en un Soxhlet, usando como disolventes los anteriormente mencionados. Finalmente, se analizó el extracto líquido, con objeto de cuantificar, en tanto por ciento, cuanto se había extraído de *LAS*. El método de análisis usado es el mismo que en el capítulo anterior (*Capítulo 3, apartado 3.4*).

Cabe resaltar que la naturaleza del *LAS* extraído provenía de varias fuentes: *LAS* precipitado en forma del sal cálcica o magnésica y *LAS* sódico adsorbido en la matriz. Ambas variedades podían ser analizadas de manera adecuada por la metodología analítica propuesta.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 4.29- Porcentaje de extracción del LAS.

DISOLVENTE	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)
Éter de petróleo	35
Agua	70
Acetona	45
Acetato de etilo	57
Metanol	98

Se observó que sólo el metanol era capaz de extraer los analitos de manera casi cuantitativa. Este hecho se explicó, debido a la alta solubilidad presentada por las sales del *LAS*, fundamentalmente cálcicas y sódicas, en medio polares orgánicos. Sin embargo, la sal cálcica del *LAS* no era tan soluble en otros medios polares como el agua, sobre todo los homólogos de mayor cadena C_{12} y C_{13} . Teniendo en cuenta los resultados, se seleccionó el metanol como disolvente de extracción.

Una vez seleccionado el disolvente de extracción, se optimizaron los parámetros instrumentales asociados a las técnicas de extracción.

3.2.1 - Soxhlet

Como ya se ha comentado, las variables implicadas en el proceso de extracción Soxhlet son múltiples: cantidad de muestras, volumen de disolvente usado para la reacción, temperatura y tiempo de extracción.

Por las mismas razones comentadas en el *Apartado 2.2.1* de este capítulo, la única variable a optimizar fue el tiempo de extracción.

El óptimo se calculó mediante un ensayo a diferentes tiempos de extracción (4 h, 6 h, 12 h, 24 h y 48 h). Para llevar a cabo el ensayo, se seleccionó una muestra para cada tipo de matriz (tierra, lodo de EDAR y sedimentos) con bajo contenido en LAS, la cual se dopó con una cantidad elevada de mezcla de LAS sódico comercial ($25 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). El tiempo óptimo se calculó de acuerdo con el máximo porcentaje de extracción de LAS al menor tiempo de extracción posible.

El ensayo se realizó a las tres matrices estudiadas (tierra, lodo de EDAR y sedimentos).

En la *Tabla 4.30*, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.30- Optimización del tiempo de extracción.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (h)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
4	66	52	59
6	86	79	79
12	93	95	95
24	95	91	98
48	92	97	90

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 12 h.

3.2.2 - Ultrasonidos

La optimización de la extracción con ultrasonidos se basó en una metodología de reciente publicación². Debido a la similitud en el sistema de extracción usado y en el tipo de matriz, se adoptaron las variables usadas por la metodología de partida.

Para comprobar la idoneidad de las variables optimizadas y su aplicación a la variedad de muestras estudiadas, se realizó un test de verificación. Para ello, se dopó con una cantidad elevada de *LAS* comercial ($5 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) a cada una de las matrices estudiadas (tierra, lodos de EDAR y sedimentos). Seguidamente, se aplicó la metodología propuesta en bibliografía. Cabe destacar la necesidad de una etapa de centrifugación, debido a que no había una separación de fases. Dependiendo del porcentaje de recuperación de *LAS* obtenido, se podía concluir la idoneidad del tratamiento propuesto.

Tabla 4.31- Condiciones de extracción del LAS.

VARIABLES DE EXTRACCIÓN	
Número de extracciones	1
Volumen de metanol (mL)	100
Tiempo (min)	10
Amplitud (%)	75
Tiempo de centrifugación (min)	10
Potencia (rpm)	4000

A la vista de los resultados obtenidos (*Tabla 4.32*), se concluyó que el método propuesto se ajustaba de manera adecuada a los diferentes tipos de matrices estudiados.

Tabla 4.32- Porcentajes de extracción LAS.

MATRIZ	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)
Tierra	97
Lodos EDAR	86
Sedimentos	94

3.2.3 - Microondas

Siguiendo un razonamiento similar al dado en el *Apartado 2.2.3* de este capítulo, la única variable susceptible de ser optimizada es el tiempo de extracción.

Para la optimización del tiempo de extracción, se realizó un ensayo en el que se estudiaron diferentes tiempos de extracción (5, 10, 15, 20 y 25 min) de una mezcla de *LAS* comercial ($25 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en diferentes muestras ambientales (tierra, lodos y sedimentos). El valor óptimo, se determinó en función del mayor porcentaje de extracción en el menor tiempo posible.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

En la **Tabla 4.33**, se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de matriz.

Tabla 4.33- Optimización del tiempo de extracción.

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)			
TIEMPO (min)	TIERRA	LODOS DE EDAR	SEDIMENTOS
5	61	47	56
10	82	63	72
15	91	91	95
20	89	88	92
25	95	89	87

El óptimo para todas las matrices estudiadas fue de 15 min.

3.2.4 - Conclusiones

A la vista de todos los resultados obtenidos, se concluyó, desde el punto de vista de la extracción del *LAS*, que no existían diferencias significativas

en el tipo de matriz. A continuación, se resumen las variables optimas usadas para cada sistema de extracción.

➤ *Soxhlet*

Tabla 4.34- Variables optimizadas para la extracción del LAS.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	250
Temperatura (°C)	100
Tiempo de extracción (h)	12

➤ *Ultrasonidos*

Tabla 4.35- Variables optimizadas para la extracción del LAS.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	100
Amplitud (%)	75
Tiempo de extracción (min)	10
Tiempo de centrifugación (min)	10
Potencia (rpm)	4000

➤ *Microondas(MAE)*

Tabla 4.36- Variables optimizadas para la extracción del LAS.

VARIABLE	ÓPTIMO
Cantidad de muestra (g)	5
Volumen de disolvente (mL)	50
Presión (bares)	70
Potencia (W)	1600
Tiempo de acon. (min)	10
Tiempo de extracción (min)	15
Tiempo de enfri. (min)	25

3.3 - Estudio del proceso de extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) ha sido utilizada ampliamente para la determinación del LAS en matrices ambientales (*Capítulo 3, apartado 3.4*), principalmente por dos motivos: preconcentrar las muestras y eliminar interferentes.

Sin embargo, artículos más recientes^{3,4} proponen metodologías sin el uso de ninguna etapa de extracción en fase sólida, ya que la SPE presenta varias desventajas: aumenta el tiempo y coste del análisis y aumenta la incertidumbre del resultado final, debido a que se establece una nueva etapa con una incertidumbre asociada a la misma.

³ Villar M., Callejón M., Jiménez J.C., Alonso E., Guiráum A. *Optimización and validation of new method for análisis of linear alkylbenzene sulfonates in sewage sludge by liquid chromatography alter microwave-assisted extraction*. Analytica Chimica Acta 599:92-97, 2007.

⁴ Santos J.L., Aparicio I., Alonso E. *A new method for the rutine análisis of LAS and PAH in sewage sludge by simultaneous sonicated-assisted extraction prior lo liquid chromatographic determination*. Analytica Chimica Acta. 605: 102-109, 2007.

Para evaluar, en nuestro caso, la necesidad de añadir una etapa de SPE después de llevar a cabo la extracción, se recurrió al siguiente estudio: se seleccionó el sedimento como matriz objeto de estudio, ya que era la matriz que poseía mayor cantidad de interferentes para el caso del LAS, por lo tanto, su resultado, en caso de desecharse la utilización de cartuchos de SPE, sería extrapolable al resto de matrices.

A continuación, la muestra dopada fue sometida a un proceso de extracción con microondas. Después, se recogió una alícuota de 10 mL y se le aplicó el proceso de extracción en fase sólida descrito en bibliografía². Del mismo modo, se separó otra alícuota de 10 mL, la cual, de acuerdo con lo descrito en el **Capítulo 3** de la presente Memoria, fue evaporada hasta sequedad y posteriormente disuelta en un volumen de 1 mL de mezcla agua:metanol (60:40 v/v). Para finalizar, ambos extractos fueron inyectados en el cromatógrafo. Por comparación del perfil cromatográfico obtenido en ambos casos, se podía concluir la necesidad o no de establecer una etapa de extracción en fase sólida.

A la vista de los cromatogramas obtenidos, que se muestran a continuación, se desechó la posibilidad de añadir una etapa de extracción en fase sólida, ya que ambos cromatogramas mostraban un perfil muy parecido.

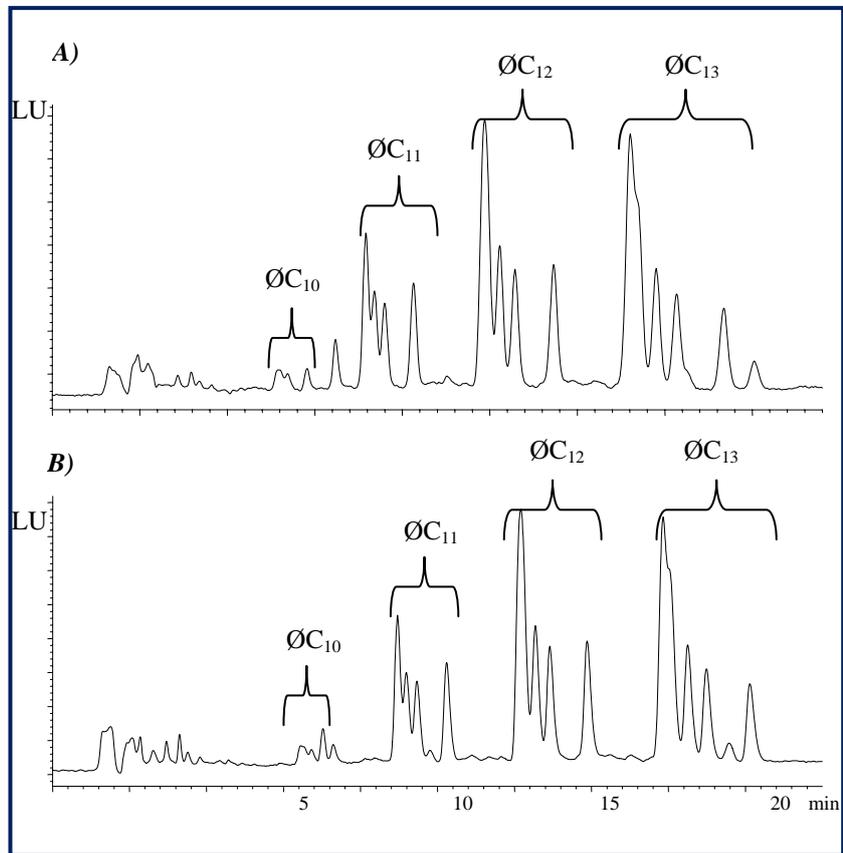


Figura 4.14- Cromatograma obtenido después de: A) sin aplicar SPE y B) aplicando SPE.



CAPÍTULO 5
PARÁMETROS ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN



1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se presenta el establecimiento de la metodología para la cuantificación de los analitos objetos de estudio (*LAS* y jabón) en diferentes matrices (tierras, lodos de EDAR y sedimentos) y con diferentes técnicas de extracción (Soxhlet, ultrasonidos y microondas).

En el segundo apartado, justo después de la introducción, se desarrolla la metodología de cuantificación para el caso del jabón. El apartado comienza exponiendo de manera breve la problemática asociada al establecimiento de un método de cuantificación en muestras que contienen estos analitos, presentando, a continuación, los resultados obtenidos mediante el desarrollo de una metodología alternativa para verificar el efecto matriz. Cabe destacar que este proceso se llevó a cabo para cada matriz ambiental y para cada técnica de extracción. A continuación, se presentan los resultados del cálculo de los parámetros analíticos característicos una vez comprobada la idoneidad del proceso descrito anteriormente.

Del mismo modo, en el tercer apartado, se detalla el proceso seguido para el caso del *LAS*, el cual se estructura de manera similar al del jabón, empezando por una pequeña descripción razonada de la metodología a seguir, y terminando con una presentación de los parámetros analíticos.

En el último apartado, se realiza un estudio estadístico comparativo de las diferentes técnicas de extracción usadas. Para ello se analizaron una amplia variedad de muestras. A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó una técnica de extracción, la cual fue usada para realizar los experimentos y estudios posteriores.

2.- METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN: CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DE JABÓN

2.1 - Justificación y propuesta de la metodología de cuantificación

El establecimiento de la metodología analítica para la cuantificación de los analitos seleccionados en una muestra consta de varias partes:

- Obtención de la función de calibración estándar de los analitos seleccionados.
- Obtención de la función de calibración en muestra de los analitos seleccionados. La muestra seleccionada debe ser representativa y que no contenga los analitos objetos de estudio.
- Comparar la pendiente y la ordenada en el origen de ambas funciones de calibración.

En el caso de que en el estudio estadístico se concluya que no hay diferencia significativa entre la pendiente y la ordenada en el origen, se puede establecer que no existe efecto matriz en la muestra estudiada y, por tanto, se puede usar la función de calibración estándar para la cuantificación de los analitos seleccionados en dicha muestra. Este hecho ocurriría cuando la matriz no influye ni el proceso de extracción (recuperación del orden del 100%) ni en el proceso de medida.

En el caso de que si existiera diferencia significativa habría que evaluar si hay efecto matriz en el proceso de medida de la señal analítica. Si no hay diferencia significativa entre la pendiente y la ordenada en el origen de la función de calibración estándar y una función de calibración obtenida al dopar con concentraciones creciente de patrón extractos de la muestra previamente tratada, entonces, la matriz solamente influiría en el proceso de extracción. Haciendo el cociente entre la pendiente de la función de calibración en muestra y la pendiente de la función de calibración de adición de patrón se obtendría el valor de la recuperación. Si hay efecto matriz, independientemente del proceso que se vea afectado, es necesario utilizar la función de calibración en muestra para cuantificar los analitos seleccionados.

En el caso del jabón, el proceso general para el establecimiento de la metodología de cuantificación anteriormente descrito no se puede aplicar de manera satisfactoria, debido a que cualquier matriz representativa contiene cantidades elevadas de jabón cálcico. Para solucionar el problema, se estudiaron varias posibilidades.

En primer lugar, se planteó la idea de dopar con cantidades elevadas de jabón ($50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), como ya se ha descrito en capítulos anteriores para hacer los estudios de los tratamientos de muestra. Sin embargo, este

proceso se descartó, debido a que se obtendrían parámetros analíticos muy elevados, límites de detección y cuantificación del orden de $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, lo que limitaría el uso de la metodología propuesta a sólo muestras con alto contenido en jabón cálcico.

A continuación, se estudió “limpiar” la matriz mediante una extracción previa de los analitos que contuviera la muestra. Tras este tratamiento, se podría establecer una metodología de cuantificación como la anteriormente expuesta. Sin embargo, llevar a cabo un proceso de extracción previo, alteraría las propiedades físicas y químicas de la matriz, con lo que los resultados obtenidos podrían ser cuestionables, sobre todo si tenemos en cuenta que el jabón, como cualquier tensioactivo de tipo aniónico, tiene tendencia a adsorberse en la matriz. Por lo tanto, también se desechó esta posibilidad.

Por último, se planteó utilizar sales cálcicas de ácido grasos que no están presentes ni en el jabón ni en las muestras a estudiar con el fin de evaluar el posible efecto matriz. Los resultados obtenidos para estas sustancias se podrían extrapolar, debido a su similitud, al comportamiento general del jabón estudiado.

Las sales cálcicas de los ácidos grasos C_{13} y C_{17} eran compuestos que cumplían las premisas anteriormente expuestas, ya que son sustancias con propiedades física y químicas parecidas al jabón analizado ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$) y además, a priori, ninguno de estos compuestos debería estar presentes en las matrices objeto de estudio. Además, presentaban la ventaja de haber sido utilizados en la puesta a punto de las condiciones cromatográficas (*Capítulo 3*), por lo que no era necesario el desarrollo de una nueva metodología para su determinación.

Cabe resaltar que, hasta el momento, y según la bibliografía consultada, no se había aplicado esta metodología a ninguno de los analitos objetos de estudio.

Se optó por usar los dos patrones para el estudio debido a que el comportamiento ambiental del C_{13} -Ca se podía asemejar al rango C_8 - C_{14} del jabón analizado. Del mismo modo, el patrón C_{17} -Ca presentaba unas propiedades físicas y químicas parecidas al rango C_{16} - C_{18} del jabón estudiado.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la problemática planteada y las posibles soluciones estudiadas, el establecimiento de la metodología de cuantificación consistió en dopar una muestra correspondiente a cada una de las matrices objeto de estudio con cantidades crecientes de ambos patrones (C_{13} -Ca y C_{17} -Ca) para obtener la función de calibración en muestra. La pendiente y la ordenada en el origen de la función de calibración generada fueron comparadas con la función de calibración estándar para estos mismos patrones. Mediante este estudio, se pudo evaluar el efecto matriz para cada tipo de muestra.

En los apartados que vienen a continuación, se detalla el proceso seguido para el establecimiento de la metodología de cuantificación.

2.2 - Evaluación del efecto matriz y de la recuperación

Para estimar tanto el efecto matriz como la recuperación, se preparó una función de calibración estándar siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- Se preparó una disolución estándar de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{C}_{13}\text{-Ca}$ y $\text{C}_{17}\text{-Ca}$ en isopropanol.
- Se añadieron volúmenes crecientes (0.05 mL, 0.25 mL, 1.00 mL, 2.50 mL, 5.00 mL, 10.00 mL) de la disolución estándar en los recipientes de extracción (tubos de teflón para el microondas, tubos de vidrio para Soxhlet y vasos de metal para el ultrasonidos)
- Se evaporó el isopropanol a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.
- Y se aplicó el tratamiento de muestra previamente optimizado (extracción con éter de petróleo, reacción de conversión y extracción con metanol) y la reacción de derivación para fluorescencia.

La función de calibración en muestra se obtuvo aplicando el protocolo el protocolo que se describe a continuación:

- Se preparó una disolución estándar de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para $\text{C}_{13}\text{-Ca}$ y $\text{C}_{17}\text{-Ca}$ en isopropanol.
- Se añadieron volúmenes crecientes (0.05 mL, 0.25 mL, 1.00 mL, 2.50 mL, 5.00 mL, 10.00 mL) de la disolución estándar en los recipientes de extracción (tubos de teflón para el microondas, tubos de vidrio para Soxhlet y vasos de metal para el ultrasonidos)
- Se evaporó el isopropanol a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.

- Se añadieron 5 gramos de muestra en cada recipiente de extracción.
- Y se aplicó el tratamiento de muestra previamente optimizado (extracción con éter de petróleo, reacción de conversión y extracción con metanol) y la reacción de derivación para fluorescencia.

De una forma parecida a la función de calibración en muestra, se obtuvo la función de calibración de adición de patrón, con la peculiaridad de que no se añadía los volúmenes crecientes de los patrones antes de las extracciones, sino después de las mismas en forma de sal potásica, justo antes de la reacción de derivación.

Siguiendo el protocolo anteriormente expuesto, se obtuvieron 6 niveles de concentración ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $2.5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $25 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $50 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $100 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) con tres réplicas por cada nivel, para un total de 18 puntos.

Para evaluar el efecto matriz, se compararon las pendientes y las ordenadas en el origen obtenidas en la función de calibración en muestra y en la función de calibración estándar.

En el caso de que existiera efecto matriz, mediante la comparación estadística (F-Snedecor y t-Student) de las pendientes y las ordenadas en el origen de la función de calibración estándar y la función de calibración de adición de patrón, se estimaría el origen del posible efecto matriz.

Por otro lado, comparando las pendientes de la función de calibración en muestra y de la función de calibración de adición de patrón, se evaluó la

recuperación, teniendo en cuenta que los valores obtenidos en la función de calibración de adición de patrón equivalían al 100% de recuperación.

Este protocolo, se aplicó a las diferentes técnicas de extracción utilizadas (Soxhlet, ultrasonidos y microondas) en las diferentes matrices estudiadas (tierra, lodos de EDAR y sedimentos).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos agrupados por técnicas de extracción en primer lugar y por tipo de matriz en segundo lugar.

2.2.1 - Soxhlet

➤ Tierra

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.1- Parámetros estadísticos $C_{13}\text{-Ca}$ y $C_{17}\text{-Ca}$.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
a	41.2	12.0	55.9	25.5	20.1	11.2
s_a	9.1	5.6	15.8	5.8	8.7	4.7
b (Kg·mg⁻¹)	94.9	39.9	94.1	39.5	89.2	37.2
s_b	2.5	2.1	2.3	1.8	2.3	1.6
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8
S_{y/x}	10.3	4.1	39.2	19.2	18.0	15.5

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Con motivo de evaluar el origen del efecto matriz, en la **Tabla 5.2** se presentan los valores tabulados y calculados, de la *F-Snedecor* y la *t-Student*. Dependiendo del si el valor de F calculado era mayor o menor al tabulado, se utilizó una ecuación u otra para determinar el valor de t calculado.

Tabla 5.2- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}^1	14.5	21.9
$t_{cal} b^2$	0.2	0.1
$t_{cal} a^2$	0.8	1.7

¹ *F* tabulado (g.l.: 17, 16 *P* = 0.95) 2.34. ² *t* tabulado (g.l.: 17, *P* = 0.95) = 2.12

Como se puede observar, los valores de t calculados para ambos patrones son menores que el valor de t tabulado, por lo que las pendientes y las ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación del proceso de extracción:

Tabla 5.3- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b₂	89.2	37.2
b₃	94.1	39.5
R (%)	95	94

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.4- Parámetros estadísticos C₁₃-Ca y C₁₇-Ca.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
a	41.2	12.0	57.6	23.2	44.3	27.2
s_a	9.1	5.6	18.5	5.2	11.3	10.7
b (Kg·mg⁻¹)	94.9	39.9	93.5	38.7	88.2	36.2
s_b	2.5	2.1	2.0	2.8	2.9	2.5
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.8	99.7	99.5
S_{y/x}	10.3	4.1	49.2	29.2	28.0	41.5

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Con motivo de evaluar el origen del efecto matriz, en la **Tabla 5.5** se presentan los valores tabulados y calculados, de la *F-Snedecor* y la *t-Student*.

Tabla 5.5- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}^1	22.8	50.7
$t_{cal} b^2$	0.4	0.3
$t_{cal} a^2$	0.7	1.5

¹ *F* tabulado (g.l.: 17, 16 *P* = 0.95) 2.34. ² *t* tabulado (g.l.: 17, *P* = 0.95) = 2.12

Los valores de *t* calculado para ambos patrones son menores que los valores de *t* tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.6- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b_2	88.2	36.2
b_3	93.5	38.7
R (%)	94	93

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.7- Parámetros estadísticos $C_{13}\text{-Ca}$ y $C_{17}\text{-Ca}$.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
a	41.2	12.0	45.6	20.5	34.6	17.2
s_a	9.1	5.6	14.5	4.8	9.3	3.7
b (Kg·mg⁻¹)	94.9	39.9	94.1	39.5	90.6	36.9
s_b	2.5	2.1	2.2	2.6	2.3	1.8
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
S_{y/x}	10.3	4.1	45.6	25.2	48.4	9.7

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Con motivo de evaluar el origen del efecto matriz, en la **Tabla 5.8** se presentan los valores tabulados y calculados, de la *F-Snedecor* y la *t-Student*.

Tabla 5.8- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}^1	19.6	37.8
$t_{cal} b^2$	0.2	0.1
$t_{cal} a^2$	0.2	1.2

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.9- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b_2	90.6	36.9
b_3	94.1	39.5
R (%)	96	93

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.10- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}¹	2.4	7.1	7.2	2.6	3.0	7.2
t_{cal} b²	0.3	0.3	0.4	0.1	0.6	0.2
t_{cal} a²	1.7	1.4	1.1	1.0	0.7	0.9

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, valores de t calculados menores que los valores de t tabulados en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo.

2.2.2 - Ultrasonidos

➤ Tierra

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.11- Parámetros estadísticos $C_{13}\text{-Ca}$ y $C_{17}\text{-Ca}$.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
a	67.1	27.5	35.3	14.3	44.6	17.2
s_a	14.1	8.4	12.1	5.1	7.7	3.7
b (Kg·mg⁻¹)	92.1	38.5	91.5	38.1	87.2	35.9
s_b	4.5	4.9	3.8	2.6	1.9	2.6
R² (%)	99.8	99.7	99.8	99.7	99.6	99.4
S_{y/x}	80.3	29.8	41.3	15.2	5.4	7.0

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.12- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
F_{cal}¹	3.8	3.8
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	1.7	1.3

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto

matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.13- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b₂	87.2	35.9
b₃	91.5	38.1
R (%)	95	94

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.14- Parámetros estadísticos C₁₃-Ca y C₁₇-Ca.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
a	67.1	27.5	25.3	17.5	33.6	12.1
s_a	14.1	8.4	15.6	6.4	8.7	4.1
b (Kg·mg⁻¹)	92.1	38.5	90.5	37.8	84.7	35.7
s_b	4.5	4.9	2.1	3.7	2.1	3.3
R² (%)	99.8	99.7	99.9	99.7	99.5	99.4
S_{y/x}	80.3	29.8	21.5	47.8	11.5	9.2

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.15- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}^1	13.9	2.6
$t_{cal} b^2$	0.3	0.1
$t_{cal} a^2$	2.0	0.9

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.16- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b_2	84.7	35.7
b_3	90.5	37.8
R (%)	94	94

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.17- Parámetros estadísticos C₁₃-Ca y C₁₇-Ca.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
a	67.1	27.5	45.3	31.1	55.7	25.4
s_a	14.1	8.4	12.1	3.1	7.7	6.1
b (Kg·mg⁻¹)	92.1	38.5	91.9	38.4	86.1	36.2
s_b	4.5	4.9	3.1	4.1	3.3	3.1
R² (%)	99.8	99.7	99.8	99.9	99.6	99.4
S_{y/x}	80.3	29.8	31.7	14.1	17.9	10.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.18- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}¹	6.4	4.5
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	1.2	0.4

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.19- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b₂	86.1	36.2
b₃	91.9	38.4
R (%)	94	94

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.20- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}¹	5.4	3.4	11.0	11.7	2.4	3.5
t_{cal} b²	0.9	0.1	0.3	0.1	0.4	0.1
t_{cal} a²	0.9	0.9	1.0	1.1	1.9	1.8

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, los valores de t calculados son menores que los valores de t tabulados en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo.

2.2.3 - Microondas

➤ Tierra

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.21- Parámetros estadísticos C₁₃-Ca y C₁₇-Ca.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
a	47.1	11.5	61.0	11.3	33.1	9.5
s_a	8.1	5.1	11.7	3.6	7.8	1.1
b (Kg·mg⁻¹)	93.8	39.2	93.1	38.7	89.5	36.3
s_b	3.1	2.5	2.2	2.0	1.3	2.1
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8
S_{y/x}	30.3	10.7	18.3	21.5	11.4	4.5

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.22- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}^1	2.7	4.0
$t_{\text{cal}} b^2$	0.2	0.2
$t_{\text{cal}} a^2$	1.0	0.1

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.23- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b_2	89.5	36.3
b_3	93.1	38.7
R (%)	96	94

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.24- Parámetros estadísticos C₁₃-Ca y C₁₇-Ca.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
a	47.1	11.5	51.0	21.7	33.6	10.5
s_a	8.1	5.1	17.5	3.9	12.1	2.1
b (Kg·mg⁻¹)	93.8	39.2	92.5	38.3	88.1	35.1
s_b	3.1	2.5	2.8	2.4	1.7	2.1
R² (%)	99.9	99.9	99.7	99.7	99.6	99.6
S_{y/x}	30.3	10.7	15.6	27.1	25.4	19.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.25- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}¹	3.8	6.4
t_{cal} b²	0.3	0.3
t_{cal} a²	0.2	1.6

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.26- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b₂	88.1	35.1
b₃	92.5	38.3
R (%)	95	92

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.27- Parámetros estadísticos $C_{13}\text{-Ca}$ y $C_{17}\text{-Ca}$.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		EN MUESTRA	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
a	47.1	11.5	41.3	20.7	30.1	9.1
s_a	8.1	5.1	15.4	2.1	12.5	1.9
b (Kg·mg⁻¹)	93.8	39.2	93.1	38.9	89.4	35.9
s_b	3.1	2.5	2.4	2.1	1.9	2.5
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.7
S_{y/x}	30.3	10.7	9.1	19.0	5.1	8.8

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.28- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	$C_{13}\text{-Ca}$	$C_{17}\text{-Ca}$
F_{cal}¹	11.1	3.2
t_{cal} b²	0.2	0.9
t_{cal} a²	0.3	1.7

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculado para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto

matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.29- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
b₂	89.4	35.9
b₃	93.1	38.9
R (%)	96	92

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.30- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca	C ₁₃ -Ca	C ₁₇ -Ca
F_{cal}¹	5.0	18.0	5.0	4.7	24.8	3.8
t_{cal} b²	0.7	0.4	0.1	0.1	0.5	0.2
t_{cal} a²	0.1	0.4	0.2	0.2	0.2	0.5

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, los valores de t calculados son menores que los valores de t tabulados en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo.

2.2.4 - Comparación de los parámetros estadísticos entre técnicas de extracción

En el apartado anterior, se comprobó que no existía diferencia significativa en el tipo de matriz usado para cada técnica de extracción, ya que todas presentaban pendientes y ordenadas en el origen estadísticamente similares. De la misma manera, en este apartado, se estudió el nivel de significancia entre las diferentes técnicas de extracción. Teniendo en cuenta que todas las matrices eran estadísticamente similares, se seleccionó la función de calibración en muestra y como matriz la tierra para el estudio comparativo de las tres técnicas de extracción, por ser el más sencillo desde un punto de vista operacional. En la **Tabla 5.31** se muestran los parámetros del calibrado en muestra de tierra para cada técnica de extracción.

Tabla 5.31- Parámetros estadísticos C_{13} -Ca y C_{17} -Ca de la función de calibración en muestra.

	SOXHLET		ULTRASONIDOS		MICROONDAS	
	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca
a	20.1	11.2	44.6	17.2	33.1	9.5
s_a	8.7	4.7	7.7	3.7	7.8	1.1
b (Kg·mg⁻¹)	89.2	37.2	87.2	35.9	89.5	36.3
s_b	2.3	1.6	1.9	2.6	1.3	2.1
S_{y/x}	18.0	11.5	5.4	7.0	11.4	4.5

En la tabla que viene a continuación, se muestran los resultados obtenidos del tratamiento estadístico de las pendientes y las ordenadas en el origen mostradas en la tabla anterior.

Tabla 5.32- Tratamiento estadístico.

	SOX VS ULTRA		SOX VS MAE		MAE VS ULTRA	
	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca	C_{13} -Ca	C_{17} -Ca
F_{cal}¹	11.1	2.7	2.5	6.5	4.5	2.4
t_{cal} b²	0.7	0.4	0.1	0.3	1.0	0.1
t_{cal} a²	2.0	1.0	1.1	0.3	1.0	2.0

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

A la vista de los resultados, se llegó a la conclusión de que las pendientes y las ordenadas en el origen eran estadísticamente similares, ya que los valores de t calculados eran menores que el valor de t tabulados. Por lo tanto, la función de calibración en muestra obtenida para una técnica de extracción en concreto era aplicable al resto de las técnicas estudiadas.

2.2.5 - Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, se pudieron establecer las siguientes conclusiones:

- 1) Existía efecto matriz. Por lo tanto, era de esperar que también hubiera efecto matriz para los analitos objetos de estudio (jabón cálcico C₈-C₁₈).
- 2) De acuerdo a los resultados estadísticos, el efecto matriz era consecuencia directa del proceso de extracción.
- 3) Las recuperaciones en todos los estudios fueron altas, entre el 92% y el 96%.
- 4) No existían diferencias significativas entre las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas para cada una de las matrices y técnicas de extracción estudiadas, por lo que una función de calibración en muestra de una matriz y técnica de extracción en concreto se podía aplicar al resto de matrices y técnicas de extracción empleadas.
- 5) Por tanto, se pudo concluir que para calcular los parámetros analíticos de las metodologías propuestas, se podían determinar mediante una sola función de calibración, la cual podía ser usada independientemente del tipo de matriz o del tipo de tratamiento de muestra usado.

2.3 - Cálculo de los parámetros analíticos

Teniendo en cuenta las conclusiones mostradas en el apartado anterior, para el cálculo de los parámetros analíticos, se utilizó una función de calibración en muestra de tierra, a la cual se le aplicó la metodología descrita para microondas, debido que era más sencillo desde un punto de vista operacional. Esta función de calibración se realizó para cada analito objeto de estudio (C_8 - C_{18}).

La función de calibración consistió en añadir, en varios vasos de extracción, cantidades crecientes de disolución mezcla de jabón cálcico, hasta obtener, después del tratamiento de muestra y derivación, un rango de concentraciones iniciales, teniendo en cuenta que se van a añadir 5 g de muestra, de entre 1 y 150 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para el caso de la fluorescencia y de 1 a 50 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para absorbancia. Por lo tanto, se obtendrán dos funciones de calibración, una para la detección por fluorescencia y otra para la detección por absorción ultravioleta. Los procedimientos de tratamiento de muestra y derivación han sido objeto de estudio en los *Capítulos 3 y 4* de la presente Memoria de Tesis.

Se ensayaron seis niveles de concentración, 1, 5, 20, 50, 100 y 150 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para el caso de la fluorescencia y 1, 2.5, 5, 12.5, 25, 50 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para el caso de la absorbancia. Cada nivel constó de tres réplicas experimentales y por cada réplica experimental tres instrumentales, para obtener un total de nueve puntos por nivel de concentración. Para la obtención de la función de calibración se empleó como variable dependiente la relación de áreas entre cada patrón y el área del patrón interno seleccionado y que fue la sal potásica del ácido graso C_{13} . El patrón interno fue añadido después de la extracción.

En las siguientes tablas, se muestran los parámetros analíticos obtenidos:

Tabla 5.33- Función de calibración en LC-FLD. Parámetros analíticos.

Jabón	b (Kg·mg ⁻¹)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{y/x}	P _{lof} (%)
C ₈	1.31	2.33	0.10	1.12	99.87	2.78	34.5
C ₁₀	1.82	2.78	0.33	1.89	99.91	4.32	45.8
C ₁₂	1.78	3.56	0.43	0.44	99.93	3.36	67.4
C ₁₄	1.09	1.54	0.04	2.43	99.88	3.78	39.7
C ₁₆	1.22	2.34	0.43	4.67	99.95	3.67	86.8
C _{18:1}	0.41	5.67	0.13	5.89	99.96	0.76	57.4
C ₁₈	1.29	2.86	0.21	1.34	99.85	3.24	23.7

Tabla 5.34- Función de calibración en LC-DAD. Parámetros analíticos.

Jabón	b (Kg·mg ⁻¹)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{y/x}	P _{lof} (%)
C ₈	0.023	1.38	0.024	2.37	99.77	0.056	44.5
C ₁₀	0.019	1.67	0.034	2.76	99.81	0.045	33.3
C ₁₂	0.021	2.67	0.049	1.67	99.85	0.067	45.9
C ₁₄	0.014	2.18	0.027	4.76	99.98	0.028	59.2
C ₁₆	0.012	2.54	0.037	3.28	99.92	0.028	71.3
C _{18:1}	0.006	1.34	0.025	1.98	99.84	0.003	81.1
C ₁₈	0.012	1.67	0.022	1.56	99.93	0.043	51.5

Con respecto a los analitos estudiados durante la separación cromatográfica, no se incluyó compuesto C_{18:2}-Ca, debido a que presentaba un comportamiento anómalo durante la derivación y posterior cuantificación, ya que el compuesto se degradaba con facilidad y no presentaba una buena linealidad.

2.3.1 - 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 5.33** y en la **Tabla 5.34**, en todos los casos el valor P fue mayor del 5%, por tanto, se concluyó que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustaban 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 observó que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se pudo afirmar que los datos eran homocedásticos.

2.3.2 - 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 blancos que se extrajeron y derivaron según los procedimientos operatorios descritos en capítulos anteriores. Posteriormente, se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, fijando las condiciones instrumentales. Los resultados obtenidos son los mostrados en las siguientes tablas:

Tabla 5.35- Valores de $W_{0.5}$, W_{b0} y de los intervalos de integración. (LC-FLD).

Jabón	$W_{0.5h}$	W_{b0}	$t_R \pm 0.5 W_{b0}$
C ₈	0.84	2.14	4.5 ± 0.42
C ₁₀	0.78	1.99	6.2 ± 0.39
C ₁₂	0.67	1.71	8.7 ± 0.34
C ₁₄	0.54	1.38	12.1 ± 0.27
C ₁₆	0.81	2.06	15.2 ± 0.41
C _{18:1}	0.77	1.96	15.7 ± 0.39
C ₁₈	0.45	1.15	19.3 ± 0.23

Tabla 5.36- Valores de $W_{0.5}$, W_{b0} y de los intervalos de integración. (LC-DAD).

Jabón	$W_{0.5h}$	W_{b0}	$t_R \pm 0.5 W_{b0}$
C ₈	0.14	0.36	5.9 ± 0.07
C ₁₀	0.23	0.59	7.1 ± 0.12
C ₁₂	0.14	0.36	8.3 ± 0.07
C ₁₄	0.17	0.43	15.1 ± 0.09
C ₁₆	0.11	0.28	19.2 ± 0.06
C _{18:1}	0.09	0.23	20.1 ± 0.05
C ₁₈	0.08	0.20	26.3 ± 0.04

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 5.37 y 5.38**.

Tabla 5.37- Límites de detección y cuantificación. (LC-FLD).

Jabón	S ₀	LD (mg·Kg ⁻¹)	LC (mg·Kg ⁻¹)
C ₈	0.051	0.15	0.51
C ₁₀	0.044	0.13	0.44
C ₁₂	0.038	0.11	0.38
C ₁₄	0.054	0.16	0.54
C ₁₆	0.058	0.17	0.58
C _{18:1}	0.044	0.13	0.44
C ₁₈	0.040	0.12	0.40

Tabla 5.38- Límites de detección y cuantificación. (LC-DAD).

Jabón	S ₀	LD (mg·Kg ⁻¹)	LC (mg·Kg ⁻¹)
C ₈	0.067	0.20	0.67
C ₁₀	0.054	0.16	0.54
C ₁₂	0.076	0.23	0.76
C ₁₄	0.057	0.17	0.57
C ₁₆	0.044	0.13	0.44
C _{18:1}	0.062	0.19	0.62
C ₁₈	0.066	0.20	0.66

2.3.3 - Rango dinámico lineal y linealidad

En las *Tablas 5.39* y *5.40*, se presentan el Rango Dinámico Lineal (*RDL*), la linealidad (*LIN*), la Desviación Estándar Relativa (*DER*) y la sensibilidad analítica (*S_{analítica}*) obtenidos tanto para fluorescencia como para absorbancia. La linealidad fue calculada como linealidad “*on-line*”.

Tabla 5.39- Rango dinámico lineal y linealidad. (LC-FLD).

Jabón	RDL (mg·Kg ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S _{ana.} (mg·Kg ⁻¹)
C ₈	0.5 - 150.0	98.7	4.7	2.1
C ₁₀	0.4 - 150.0	98.8	2.8	2.4
C ₁₂	0.4 - 150.0	98.5	2.8	1.9
C ₁₄	0.5 - 150.0	98.8	2.6	3.5
C ₁₆	0.6 - 150.0	98.6	0.8	3.0
C _{18:1}	0.4 - 150.0	98.6	1.4	1.8
C ₁₈	0.4 - 150.0	98.5	3.0	2.5

Tabla 5.40- Rango dinámico lineal y linealidad. (LC-DAD).

Jabón	RDL (mg·Kg ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S _{ana.} (mg·Kg ⁻¹)
C ₈	0.7 - 50.0	98.3	4.3	2.4
C ₁₀	0.5 - 50.0	98.6	2.4	2.4
C ₁₂	0.8 - 50.0	98.7	2.6	3.5
C ₁₄	0.6 - 50.0	98.3	2.3	2.0
C ₁₆	0.4 - 50.0	98.5	1.1	2.3
C _{18:1}	0.6 - 50.0	98.6	1.5	2.0
C ₁₈	0.7 - 50.0	98.6	2.6	3.6

En todos los casos la linealidad es superior al 95%. Por tanto, se puede afirmar que los datos experimentales se ajustaban al modelo lineal propuesto.

2.3.4 - Precisión

Para evaluar este parámetro, se doparon tres muestras dopadas con disolución de jabón cálcico para obtener una concentración final de 10.00 mg·Kg⁻¹. Para cada punto experimental se realizaron tres réplicas instrumentales. Las determinaciones fueron realizadas en el mismo día estimando así, la repetitividad del método. Las disoluciones fueron tratadas mediante el tratamiento de muestra para microondas descrito con anterioridad e inyectadas en el cromatógrafo de líquidos, fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 5.39 y 5.40**.

Se observó que, en todos los casos, las desviaciones estándar relativas fueron menores del 10%, por lo que se pudo concluir que el método propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumplía con los requisitos de precisión.

2.3.5 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se presentan en las **Tablas 5.39 y 5.40**.

3.- METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN: CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS EN LA DETERMINACIÓN DEL LAS

3.1 - Justificación y propuesta de metodología de validación

El LAS, al igual que el jabón, es un tensioactivo aniónico, por lo que la problemática descrita a la hora del establecimiento de la metodología para la cuantificación del jabón es extrapolable al LAS.

Debido a su gran consumo y a sus propiedades físicas, el LAS se encuentra en grandes cantidades en el medio ambiente, por lo que su presencia en las matrices objeto de estudio era elevada, dificultando, al igual que el jabón, su cuantificación por cualquiera de los métodos usuales.

Para solucionar este problema, en la mayoría de los artículos consultados (*Capítulo 1, apartado 2.5.1*), se suele llevar a cabo una extracción previa de la matriz, para luego hacer un proceso de dopaje y recuperación. Sin embargo, como ya se ha descrito, este proceso altera la matriz de origen, con la consiguiente pérdida de representatividad de la muestra.

En nuestro caso, para resolver el problema del establecimiento de la metodología para la cuantificación del LAS, se planteó, al igual que para el jabón, usar durante la puesta a punto de la metodología para la cuantificación sustancias de comportamiento físico y químico lo más afín posible al LAS, y que no estuvieran presentes en ninguna de las matrices a estudiar. El $2\text{ØC}_8\text{-LAS}$ y $2\text{ØC}_{16}\text{-LAS}$ eran compuestos que cumplían las premisas anteriormente expuestas, ya que eran sustancias con propiedades físicas y químicas parecidas a la mezcla del LAS analizado y, a priori,

ninguno de estos compuestos, puesto que no son comerciales, debería estar presentes en el medio. Además, poseían la ventaja de que habían sido utilizados, durante el **Capítulo 3** de la presente memoria, en la puesta a punto de las condiciones cromatográficas, por lo que no era necesario el desarrollo de una nueva metodología para su determinación.

A la hora de elegir uno de los dos patrones, se optó por usar ambos, debido a que, el *LAS* comercial presentaba una media de longitud de cadena carbonada, intermedia entre ambos patrones, por lo que si se usara sólo uno de ellos, su resultado no podía ser extrapolable a la mezcla del *LAS*. En cambio, si se conoce el comportamiento de los extremos, se podía conocer, por extrapolación, el comportamiento de la parte media (mezcla comercial del *LAS*).

Por lo tanto, para el establecimiento de la metodología de cuantificación se siguió un planteamiento similar al expuesto en el **Apartado 2.1** del presente Capítulo.

Del mismo modo que en el caso del jabón, cabe resaltar que, hasta el momento, y según la bibliografía consultada, no se había aplicado esta metodología de cuantificación ni a ninguno de los analitos objetos de estudio.

En los apartados que vienen a continuación, se detalla el proceso seguido para el establecimiento de la metodología de cuantificación.

3.2 - Evaluación del efecto matriz y de la recuperación

El protocolo para la obtención de las tres funciones de calibración fue similar al expuesto para el caso del jabón (*Capítulo 5, apartado 2.2*). Como diferencia más significativa con respecto al protocolo propuesto para el jabón, aparte de las diferencias en cuanto al tratamiento de muestra y análisis, fue que los patrones fueron disueltos en metanol en vez de isopropanol, debido a que presentaban una mayor solubilidad que el jabón.

Este protocolo se aplicó, al igual que para el jabón, a las diferentes técnicas de extracción usadas (Soxhlet, ultrasonidos y microondas) en las diferentes matrices estudiadas (tierra, lodos de EDAR y sedimentos).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos agrupados por técnicas de extracción.

3.2.1 - Soxhlet

➤ *Tierra*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.41- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	118.0	110.1	55.9	118.0	110.1	55.9
s_a	50.2	48.5	34.8	50.2	48.5	34.8
b (Kg·mg⁻¹)	368.2	356.9	366.8	368.2	356.9	366.8
s_b	8.5	19.3	5.6	8.5	19.3	5.6
R² (%)	99.8	99.9	99.9	99.8	99.9	99.9
S_{y/x}	225.3	128.4	128.3	225.3	128.4	128.3

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.42- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	3.1	4.8
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	1.0	1.4

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto

matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.43- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	350.2	326.2
b₃	366.8	354.9
R (%)	95	92

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.44- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆.

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	118.0	110.1	126.9	47.5	75.2	36.2
s_a	50.2	48.5	48.3	56.1	10.5	21.2
b (Kg·mg⁻¹)	368.2	356.9	364.3	353.2	344.2	320.2
s_b	8.5	19.3	7.6	18.8	10.3	16.6
R² (%)	99.8	99.9	99.8	99.8	99.7	99.7
S_{y/x}	225.3	128.4	134.3	76.2	62.5	42.3

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.45- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	2.8	2.8
t_{cal} b²	0.3	0.1
t_{cal} a²	0.1	0.8

¹ *F* tabulado (g.l.: 17, 16 *P* = 0.95) 2.34. ² *t* tabulado (g.l.: 17, *P* = 0.95) = 2.12

Los valores de *t* calculado para ambos patrones son menores que los valores de *t* tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.46- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	344.2	320.2
b₃	364.3	353.2
R (%)	94	91

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.47- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	118.0	110.1	177.1	61.3	43.1	81.5
s_a	50.2	48.5	98.3	33.5	17.1	11.3
b (Kg·mg⁻¹)	368.2	356.9	367.5	356.3	347.2	323.6
s_b	8.5	19.3	8.9	15.3	10.9	19.1
R² (%)	99.8	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8
S_{y/x}	225.3	128.4	214.1	91.5	211.1	21.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.48- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	3.9	4.4
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	0.5	0.8

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.49- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	347.2	323.6
b₃	367.5	356.3
R (%)	94	91

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.50- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	4.2	7.7	2.7	37.8	11.4	4.9
t_{cal} b²	0.5	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
t_{cal} a²	0.4	0.4	0.7	0.2	1.4	0.2

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, valores de t calculados menores que los valores de t tabulados en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo.

3.2.2 - Ultrasonidos

➤ Tierra

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.51- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	132.1	82.1	71.1	44.1	41.3	59.9
s_a	77.1	17.1	12.1	8.1	4.1	28.1
b (Kg·mg⁻¹)	364.1	353.9	361.1	352.7	336.1	318.1
s_b	12.1	15.1	3.1	11.5	8.1	15.3
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.7	99.9
S_{y/x}	56.3	32.1	122.1	67.9	17.2	5.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.52- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}^1	4.7	4.5
$t_{\text{cal}} b^2$	0.2	0.1
$t_{\text{cal}} a^2$	0.2	2.0

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulado, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.53- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b_2	336.1	318.1
b_3	361.1	352.7
R (%)	93	90

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.54- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	132.1	82.1	45.6	43.9	47.8	67.9
s_a	77.1	17.1	19.5	11.6	14.7	21.4
b (Kg·mg⁻¹)	364.1	353.9	360.0	350.1	330.1	315.1
s_b	12.1	15.1	5.8	14.7	11.5	16.1
R² (%)	99.9	99.9	99.8	99.8	99.6	99.6
S_{y/x}	56.3	32.1	156.3	15.7	136.8	81.4

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.55- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	7.1	4.2
t_{cal} b²	0.3	0.1
t_{cal} a²	1.1	1.8

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.56- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	330.1	315.1
b₃	360.0	350.1
R (%)	92	90

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.57- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	132.1	82.1	33.1	53.9	45.1	51.8
s_a	77.1	17.1	12.1	9.1	11.1	11.0
b (Kg·mg⁻¹)	364.1	353.9	363.5	352.9	335.9	319.8
s_b	12.1	15.1	7.9	11.9	13.1	16.5
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8
S_{y/x}	56.3	32.1	121.1	71.2	59.1	7.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.58- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	4.6	4.9
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	1.3	1.5

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto

matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.59- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	335.9	319.8
b₃	363.5	352.9
R (%)	92	91

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.60- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	2.4	7.1	7.2	2.6	3.0	7.2
t_{cal} b²	0.3	0.3	0.4	0.1	0.6	0.2
t_{cal} a²	1.0	0.2	1.2	0.2	1.2	0.7

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, valores de t calculado menores que los valores de t tabulado en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo

3.2.3 - Microondas

➤ *Tierra*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.61- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	87.5	75.9	79.6	54.4	67.9	62.7
s_a	18.6	9.5	23.7	5.7	12.9	18.5
b (Kg·mg⁻¹)	366.5	355.9	365.8	354.7	339.8	322.6
s_b	15.6	17.1	7.9	10.9	10.7	13.9
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9
S_{y/x}	125.0	61.1	69.7	23.1	78.9	25.1

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.62- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F _{cal} ¹	3.2	7.0
t _{cal} b ²	0.1	0.1
t _{cal} a ²	0.3	1.9

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.63- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b ₂	339.8	322.6
b ₃	365.8	354.7
R (%)	93	91

➤ *Lodos de EDAR*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.64- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	87.5	75.9	89.9	51.1	89.1	83.1
s_a	18.6	9.5	13.9	7.9	11.2	21.2
b (Kg·mg⁻¹)	366.5	355.9	363.1	353.1	337.1	320.1
s_b	15.6	17.1	8.1	11.3	11.1	15.1
R² (%)	99.9	99.9	99.8	99.8	99.6	99.7
S_{y/x}	125.0	61.1	61.5	33.5	137.1	128.9

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.65- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	4.1	3.3
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	0.1	2.0

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.66- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	337.1	320.1
b₃	363.1	353.1
R (%)	93	90

➤ *Sedimentos*

En la siguiente tabla siguiente, se muestran los parámetros estadísticos asociados a cada tipo de calibrado.

Tabla 5.67- Parámetros estadísticos 2ØC₈ y 2ØC₁₆

	ESTÁNDAR		ADICIÓN DE PATRÓN		CON MUESTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈
a	87.5	75.9	61.3	61.8	66.7	89.5
s_a	18.6	9.5	15.1	3.7	7.1	21.8
b (Kg·mg⁻¹)	366.5	355.9	365.4	354.7	341.8	325.7
s_b	15.6	17.1	10.3	9.1	9.5	12.0
R² (%)	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
S_{y/x}	125.0	61.1	68.5	24.9	21.6	55.2

A la vista de los resultados obtenidos, existe diferencia significativa entre las pendientes de la función de calibración estándar y la función de calibración en muestra, por lo que existe efecto matriz.

Tabla 5.68- Tratamiento estadístico.

	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	3.3	6.0
t_{cal} b²	0.1	0.1
t_{cal} a²	1.0	1.4

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

Los valores de t calculados para ambos patrones son menores que los valores de t tabulados, por lo que las pendientes y ordenadas en el origen son estadísticamente similares. Por tanto, se concluye que no hay efecto

matriz en el proceso de medida. La matriz solamente influye en el proceso de extracción.

Por otra parte, en la siguiente tabla se estima la recuperación:

Tabla 5.69- Recuperación.

	PARÁMETROS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆
b₂	341.8	325.7
b₃	365.4	354.7
R (%)	94	92

Para finalizar, se estudió si el efecto matriz era el mismo para las tres matrices estudiadas. Para ello, se compararon estadísticamente la pendiente y la ordenada en el origen de las tres funciones de calibración en muestra (lodo de EDAR, tierra y sedimentos).

Tabla 5.70- Tratamiento estadístico entre tipo de muestras.

	TIERRA vs LODO		TIERRA vs SEDIMENTOS		LODO vs SEDIMENTOS	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}¹	3.0	26.4	13.3	4.8	40.3	26.4
t_{cal} b²	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3
t_{cal} a²	1.2	0.7	0.1	0.9	1.7	0.2

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 P = 0.95) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, P = 0.95) = 2.12

A la vista de los resultados obtenidos, valores de t calculados menores que los valores de t tabulados en todos los casos, se pudo concluir que el efecto matriz en todas las matrices era el mismo

3.2.4 - Comparación de los parámetros estadísticos entre técnicas de extracción

Se siguió el mismo razonamiento descrito para el *Apartado 2.2.4*.

Tabla 5.71- Parámetros estadísticos 2ØC_8 y 2ØC_{16} de la función de calibración en muestra.

	SOXHLET		ULTRASONIDOS		MICROONDAS	
	2ØC_8	2ØC_{16}	2ØC_8	2ØC_{16}	2ØC_8	2ØC_{16}
a	118.0	110.1	132.1	82.1	87.5	75.9
s_a	50.2	48.5	77.1	17.1	18.6	9.5
b (Kg·mg⁻¹)	368.2	356.9	364.1	353.9	366.5	355.9
s_b	8.5	19.3	12.1	15.1	15.6	17.1
S_{y/x}	225.3	128.4	56.3	32.1	125.0	61.1

En la tabla que viene a continuación, se muestran los resultados obtenidos del tratamiento estadístico de las pendientes y las ordenadas en el origen.

Tabla 5.72- Tratamiento estadístico.

	SOX VS ULTRA		SOX VS MAE		MAE VS ULTRA	
	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆	2ØC ₈	2ØC ₁₆
F_{cal}^1	55.2	530.8	2.6	21.9	21.0	24.2
$t_{cal} b^2$	1.4	0.3	0.8	0.2	0.3	0.2
$t_{cal} a^2$	0.1	0.1	1.7	0.1	1.9	0.1

¹ F tabulado (g.l.: 17, 16 $P = 0.95$) 2.34. ² t tabulado (g.l.: 17, $P = 0.95$) = 2.12

A la vista de los resultados, se llegó a la conclusión de que las pendientes y las ordenadas en el origen eran estadísticamente similares, ya que los valores de t calculados eran menores que el valor de t tabulados. Por lo tanto, una función de calibración en muestra calculada para una técnica de extracción en concreto era aplicable al resto de las técnicas estudiadas.

3.2.5 - Conclusiones

Se alcanzaron las mismas conclusiones que en el *Apartado 2.2.5*, salvo que en el caso del *LAS* el rango de recuperación estuvo comprendido entre el 90% y el 94%.

- 1) Existía efecto matriz. Por lo tanto, era de esperar que también hubiera efecto matriz para el *LAS*.
- 2) De acuerdo a los resultados estadísticos, el efecto matriz era consecuencia directa del proceso de extracción.

- 3) Las recuperaciones en todos los estudios fueron altas, entre el 92% y el 96%.
- 4) No existían diferencias significativas entre las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas para cada una de las matrices y técnicas de extracción estudiadas, por lo que una función de calibración en muestra de una matriz y técnica de extracción en concreto se podía aplicar al resto de matrices y técnicas de extracción empleadas.
- 5) Por tanto, se pudo concluir que para calcular los parámetros analíticos de las metodologías propuestas, se podían determinar mediante una sola función de calibración, la cual podía ser usada independientemente del tipo de matriz o del tipo de tratamiento de muestra usado.

3.3 - Cálculo de los parámetros analíticos

Del mismo modo que para el caso del jabón, a la vista de los resultados, se pudo concluir que se podían determinar los parámetros analíticos del *LAS* mediante una sola función de calibración en muestra, el cual podía ser usado independientemente del tipo de matriz o tratamiento de muestra usado. En nuestro caso, al igual que el jabón, se optó por una función de calibración en muestra de tierra, aplicando el tratamiento de muestra descrito para microondas, debido que era más sencillo desde un punto de vista operacional. Esta función de calibración se realizó para cada

homólogo del LAS ($\emptyset C_{10}$, $\emptyset C_{11}$, $\emptyset C_{12}$, $\emptyset C_{13}$). De este modo, se obtuvieron los parámetros analíticos característicos para cada tipo de homólogo a determinar.

La función de calibración consistió en añadir, en varios vasos de extracción, cantidades crecientes de disolución de cada homólogo de LAS, hasta obtener, después del tratamiento de muestra y derivación, un rango de concentraciones iniciales, teniendo en cuenta que se van a añadir 5 g de muestra, de entre 1 y 10 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ para cada homólogo. Los procedimientos de tratamiento de muestra y derivación han sido objeto de estudio en los *Capítulos 3 y 4* de la presente Memoria de Tesis.

El modelo de calibración seleccionado fue el linear de regresión univariante por mínimos cuadrados. Se buscaron 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. La señal cromatográfica medida fue la relación de áreas entre cada analito y el patrón interno, en este caso $2\emptyset C_8$ -LAS.

Se ensayaron en total seis niveles de concentración, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Cada nivel constó de tres réplicas experimentales y por cada réplica experimental tres instrumentales, para obtener un total de nueve puntos por nivel de concentración. Para la obtención de la función de calibración se empleó como variable dependiente la relación de áreas entre cada patrón y el área del patrón interno seleccionado y que fue el $2\emptyset C_8$ -LAS. El patrón interno fue añadido después de la extracción.

En la presente tabla se muestran los parámetros analíticos obtenidos:

Tabla 5.73- Función de calibración. Parámetros analíticos.

Homol.	b (Kg·mg ⁻¹)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{y/x}	P _{lof} (%)
ØC ₁₀	0.141	3.35	0.11	0.82	99.97	0.28	89.1
ØC ₁₁	0.139	2.19	0.09	1.11	99.95	0.25	63.2
ØC ₁₂	0.133	1.32	0.07	0.74	99.93	0.26	54.1
ØC ₁₃	0.124	1.89	0.05	1.83	99.88	0.28	72.5

3.3.1 - Verificación del modelo

Para la verificación del modelo, se realizaron los siguientes estudios:

- 3) Evaluación del *fallo de ajuste* (P_{Lof}), para determinar la tendencia lineal de los datos. Como se observa en la **Tabla 5.73**, en todos los casos el valor P fue mayor del 5%, por tanto, se concluyó que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustaban a un modelo lineal.
- 4) 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 observó que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se pudo afirmar que los datos eran homocedásticos.

3.3.2 - Límite de detección y cuantificación

Se calcularon de la misma manera que para el jabón (**Apartado 2.3.2**).

Tabla 5.74- Valores de $W_{0.5}$, W_{b0} y de los intervalos de integración.

Homol.	$W_{0.5h}$	W_{b0}	$t_R \pm 0.5 W_{b0}$
$\emptyset C_{10}$	0.66	1.68	6.5 ± 0.66
$\emptyset C_{11}$	0.71	1.81	9.5 ± 0.71
$\emptyset C_{12}$	0.82	2.09	13.2 ± 0.34
$\emptyset C_{13}$	1.10	2.80	17.5 ± 1.10

Tabla 5.75- Límites de detección y cuantificación.

Homol.	S_0	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)
$\emptyset C_{10}$	1.1	3.3	11.0
$\emptyset C_{11}$	1.4	4.2	14.0
$\emptyset C_{12}$	1.8	5.4	18.0
$\emptyset C_{13}$	1.4	4.2	14.0

3.3.3 - Rango dinámico lineal y linealidad

En la **Tabla 5.76**, se presenta el Rango Dinámico Lineal (*RDL*), la linealidad (*LIN*), la Desviación Estándar Relativa (*DER*) y la sensibilidad analítica ($S_{analítica}$) obtenidos. La linealidad fue calculada como linealidad “on-line”.

Tabla 5.76- Rango dinámico lineal y linealidad.

Homol.	RDL (mg·Kg ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S _{ana.} (mg·Kg ⁻¹)
ØC ₁₀	0.011 - 100	98.5	3.2	2.0
ØC ₁₁	0.014 - 100	98.9	1.3	1.8
ØC ₁₂	0.018 - 100	98.5	3.2	2.0
ØC ₁₃	0.014 - 100	98.6	2.8	2.3

En todos los casos la linealidad es superior al 95%. Por tanto, se puede afirmar que los datos experimentales se ajustaban al modelo lineal propuesto.

3.3.4 - Precisión

Para evaluar este parámetro, se doparon tres muestras dopadas con disolución de LAS sódico comercial para obtener una concentración final de 10.00 mg·Kg⁻¹ de LAS total. Para cada punto experimental se realizaron tres réplicas instrumentales. Las determinaciones fueron realizadas en el mismo día estimando así, la repetitividad del método. Las disoluciones fueron tratadas mediante el tratamiento de muestra para microondas descrito con anterioridad e inyectadas en el cromatógrafo de líquidos, fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 5.39 y 5.40**.

Se observó que, en todos los casos, las desviaciones estándar relativas fueron menores del 10%, por lo que se pudo concluir que el método

propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumplía con los requisitos de precisión.

3.3.5 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se presentan en la **Tabla 5.76**.

4.- INTERCOMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

4.1 - Contextualización

En los capítulos y apartados anteriores, se describió el establecimiento de la metodología para la cuantificación en diferentes matrices ambientales (tierra, lodos de EDAR y sedimentos), usando para ello tres diferentes tratamientos de muestra, los cuales estaban basados en diferentes técnicas de extracción (Soxhlet, ultrasonidos y microondas).

En los capítulos siguientes, se describirá el análisis de una gran variedad de muestras. Debido a la complejidad, al número y cantidad de muestras, se hacía inviable la determinación de los analitos objetos de estudio en cada muestra aplicando los tres tipos de tratamiento de muestra. Por lo tanto, fue necesaria la elección de un solo tipo de tratamiento de muestra.

La selección del tipo de tratamiento para la determinación de jabón o para la determinación de *LAS*, se llevó a cabo mediante un estudio estadístico conjunto de las tres técnicas de extracción. Este estudio se basó en analizar, por las tres técnicas, un número de muestras concreto (15). Se

seleccionó aquel tratamiento de muestra que obtuvo una mejor relación entre diferentes variables para cada uno de los grupos de analitos objetos de estudio.

Para hacer la intercomparación, se utilizó como matriz quince lodos de EDAR, debido a que estas muestras presentaban entre sí una mayor variabilidad en los valores de concentración si las comparamos con las muestras de tierra y sedimentos.

Para cada tratamiento, se pesó la misma cantidad de muestra (0.5 g). Debido a la alta concentración de los analitos en la matriz, se uso menor cantidad de muestra que la usada para la validación (5.0 g). Posteriormente, se llevó a cabo, para cada técnica de extracción, el proceso de extracción y derivación (este último para el caso de los jabones), descrito y optimizado en el *Capítulo 4* de la presente Memoria.

Tras el tratamiento de muestra, y antes del proceso de derivación o preconcentración, se optó por evaporar el volumen del extracto final metanólico de cada tratamiento a 50 mL, con objeto de igualar el factor de dilución entre las técnicas.

Para la cuantificación, como ya se ha descrito, se utilizó la función de calibración en muestra de tierra obtenido anteriormente, la cual servía para todas las técnicas de extracción y matrices empleadas.

La comparación entre los valores de concentración se llevó a cabo mediante el estudio estadístico de las medias obtenidas por cada técnica de extracción. El método estadístico usado fue el análisis de la varianza (ANOVA), el cual nos permitió distinguir si había diferencia significativa

entre las medias. Si al aplicar el test-F se obtenía un valor de P menor al 0.05 (nivel de confianza del 95%), las medias no eran estadísticamente similares. En cambio, si el valor de P era mayor de 0.05, las medias eran no significativas y, por tanto, similares. Se utilizó el programa estadístico StatGraphics plus (vers. 5.1) para el cálculo de los parámetros.

Para el caso del jabón, también se comparó, a través de la tabla ANOVA, las medias obtenidas por las diferentes técnicas de derivación (fluorescencia y absorbancia), con objeto de seleccionar una técnica de derivación para analizar la variedad de muestras de los siguientes capítulos.

En los apartados que vienen a continuación, se presentan los resultados obtenidos del proceso de intercomparación para el caso del jabón y del LAS.

4.2 - Intercomparación de técnicas de extracción para la determinación de jabón

En la *Tabla 5.77* se muestran los resultados del test estadístico, usando como agente de derivación la BrMMC (fluorescencia).

A la vista de los resultados obtenidos, el P_{valor} es, en todos los casos, mayor a 0.05, por lo que las medias de los resultados son estadísticamente similares.

Teniendo en cuenta que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por cualquiera de las técnicas usadas, a la hora de seleccionar qué técnica usar para los análisis, se evaluó el tiempo de

tratamiento de cada técnica por muestra. La variable tiempo del tratamiento por muestra se calculó dividiendo el tiempo total del tratamiento por el número de muestras que pueden ser tratadas a la vez por la técnica. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.78**.

Tabla 5.77- Cálculo del P_{valor}

MUESTRA	X_{media} Sox. [g·Kg ⁻¹]	X_{media} Ultra. [g·Kg ⁻¹]	X_{media} Micr. [g·Kg ⁻¹]	P_{valor}
Andalucía1	6.95	6.88	6.91	0.28
Andalucía5	8.08	7.99	8.04	0.35
Andalucía5-cop	2.43	2.38	2.41	0.67
Aragón1	83.80	83.63	83.71	0.38
Asturias2	48.95	48.86	49.91	0.45
Baleares1 2T	9.14	9.07	9.11	0.66
Baleares3 3T	13.46	13.38	13.43	0.41
Canarias1	6.11	6.08	6.13	0.45
León3	20.09	20.01	20.11	0.21
León3 ST	14.25	14.15	14.21	0.39
Mancha2	7.47	7.42	7.45	0.39
Valencia4	11.33	11.27	11.29	0.41
Madrid7	9.47	9.39	9.42	0.47
País Vaco1	74.80	74.00	75.20	0.89
País vasco3	11.19	11.09	11.13	0.31

Tabla 5.78- Cálculo del tiempo de análisis por muestra.

	SOXHLET	ULTRASON.	MICROONDAS
N. de muestras (n)	4	2	14
Tiempo total (min)	1320	280	265
Relación (min·n ⁻¹)	330	140	18.9

Según los resultados obtenidos, el microondas (MAE) es el tratamiento de muestra más rápido, debido a que tiene la menor relación tiempo de análisis/muestra. Por lo tanto, se seleccionó el MAE como tratamiento de muestra para los análisis posteriores.

4.3 - Intercomparación de técnicas de derivación para la determinación de jabón

En la siguiente tabla, se muestran los resultados del test estadístico. Como tratamiento de muestra se usó el descrito para el microondas.

Tabla 5.79- Cálculo del P_{valor} para las reacciones de derivación.

MUESTRA	X_{media} FLD [g·Kg ⁻¹]	X_{media} DAD [g·Kg ⁻¹]	P_{valor}
Andalucía1	6.91	6.89	0.58
Andalucía5	8.04	8.11	0.25
Andalucía5-cop	2.41	2.37	0.37
Aragón1	83.71	83.61	0.58
Asturias2	49.91	49.86	0.65
Baleares1 2T	9.11	9.03	0.36
Baleares3 3T	13.43	13.35	0.52
Canarias1	6.13	6.18	0.15
León3	20.11	20.17	0.31
León3 ST	14.21	14.27	0.19
Mancha2	7.45	7.39	0.11
Valencia4	11.29	11.21	0.24
Madrid7	9.42	9.33	0.21
País Vaco1	75.20	74.70	0.51
País vasco3	11.13	11.04	0.68

A la vista de los resultados obtenidos, no hay diferencia significativa entre ambas técnicas de derivación, ya que el P_{valor} es mayor en todos los casos a 0.05.

A la hora de seleccionar una técnica de derivación para analizar las muestras, se tuvo en cuenta, en este caso, la sencillez del procedimiento operatorio. Siendo la derivación por fluorescencia más sencilla, debido a que durante el proceso de derivación, se evaporaba mucho menos volumen (2 mL frente a 10 mL). Además, poseía mayor rango dinámico lineal que la derivación por absorción ultravioleta (0.5 - 150 mg·Kg⁻¹ frente a 0.6 - 50 mg·Kg⁻¹).

4.4 - Intercomparación de técnicas de extracción para la determinación de LAS

En la siguiente tabla se muestran los resultados del test estadístico:

A la vista de los resultados obtenidos, el P_{valor} es, en todos los casos, mayor a 0.05, por lo que las medias son estadísticamente similares.

Se optó por evaluar, del igual manera que para el jabón, la variable tiempo de tratamiento por muestra. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.81**.

Tabla 5.80. Cálculo del P_{valor} · LAS.

MUESTRA	X_{media} Sox. [g·Kg ⁻¹]	X_{media} Ultra. [g·Kg ⁻¹]	X_{media} Micr. [g·Kg ⁻¹]	P_{valor}
Andalucía1	8.58	8.50	8.53	0.33
Andalucía5	6.04	5.94	5.98	0.12
Andalucía5-cop	1.45	1.41	1.41	0.45
Aragón1	2.27	2.23	2.24	0.63
Asturias2	0.85	0.82	0.82	0.21
Baleares1 2T	6.41	6.35	6.38	0.36
Baleares3 3T	10.28	10.19	10.24	0.21
Canarias1	6.23	6.18	6.21	0.18
León3	1.31	1.26	1.28	0.23
León3 ST	2.49	2.41	2.45	0.34
Mancha2	3.81	3.71	3.75	0.10
Valencia4	13.45	13.32	13.39	0.23
Madrid7	5.02	4.95	4.99	0.33
País Vaco1	4.25	4.18	4.22	0.28
País vasco3	0.71	0.68	0.70	0.42

Tabla 5.81. Cálculo del tiempo de análisis por muestra.

	SOXHLET	ULTRASON.	MICROONDAS
N. de muestras (n)	4	2	14
Tiempo total (min)	720	10	15
Relación (min·n ⁻¹)	180	5	1.1

De acuerdo con los resultados, el microondas presentaba menor relación tiempo de análisis/muestra. Por lo tanto, al igual que en el caso del jabón,

se seleccionó el microondas como técnica de extracción del *LAS* para los posteriores análisis.

4.5 - Conclusiones

A través de los ensayos realizados, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1) Para el caso del jabón, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por métodos de derivación diferentes (FLD y DAD).
- 2) Se seleccionó la reacción de derivación por fluorescencia frente a la de absorbancia para los análisis posteriores de jabón, ya que presentaba un mayor rango dinámico lineal y una mayor sencillez desde el punto de vista operacional.
- 3) No existía diferencia significativa en los resultados de los análisis de las quince muestras de lodos de EDAR para ninguno de los tratamientos optimizados, tanto para la determinación del jabón como del *LAS*.
- 4) Se seleccionó, tanto para el jabón como para el *LAS*, el microondas como tratamiento de muestra para los análisis posteriores, debido a su menor tiempo de análisis por muestra.



CAPÍTULO 6
DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN LODOS
DE EDAR



1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se presenta los resultados obtenidos al aplicar de a las metodologías propuestas a muestras reales. En este primer caso, se determinaron muestras de lodos de EDAR, las cuales fueron colectadas en diferentes puntos de la geografía de España, dando como resultado un mapa geográfico de distribución de las concentraciones de los analitos objetos de estudio (*LAS* y jabón).

En la primera parte del capítulo se aborda la determinación de *LAS* en lodos de EDAR, desarrollándose, en el primer apartado, una contextualización del proceso de determinación. Seguidamente, se describe y se caracteriza brevemente las muestras a analizar, mostrando, a continuación, los resultados de la determinación y su posterior análisis estadístico. Finalmente, en el último apartado, se expone una discusión de los resultados obtenidos, presentando una serie de conclusiones finales, a nivel nacional, acerca del comportamiento del *LAS* en los lodos de EDAR.

En la segunda parte, se expone, de forma parecida al *LAS*, la determinación del jabón en lodos de EDAR. La estructurada seguida es muy parecida a la del *LAS*, empezando por una pequeña introducción o contextualización, seguida de una descripción de las muestras analizadas y, terminando con una presentación y discusión de los resultados.

En la tercera y última parte, teniendo en cuenta todos los resultados presentados, se desarrolla una comparativa entre los dos tipos de analitos estudiados, proponiendo, al final, unas conclusiones generales acerca del comportamiento del jabón y del *LAS* en las EDAR.

2.- DETERMINACIÓN DE *LAS* EN LODOS DE EDAR

2.1 - Contextualización

En la introducción de esta Memoria de Tesis (*Capítulo 1, apartado 2.4.3*), se describieron varios procesos de monitorización del *LAS* en plantas depuradoras, analizando tanto el agua residual como los lodos secos generados tras el proceso de depuración.

Los estudios realizados demuestran la existencia de grandes cantidades de *LAS* (del orden de $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en este tipo de muestras, principalmente debido a su gran tendencia a adsorberse en los sólidos y a precipitar en presencia de aguas con alta concentración en sales.

Por otro lado, el creciente aumento de las cantidades de lodos obtenidos mediante el proceso de depuración, unido a su cada vez mayor uso como abono agrícola, ha derivado en un mayor control ambiental de las sustancias constituyentes de ese lodo. Por ese motivo, la Unión Europea, a

través de varias directivas^{1,2}, estableció una regulación del uso de los lodos en la agricultura y un control de calidad de ciertas sustancias existentes en los lodos con peligro potencial para el medio.

El LAS, al ser una sustancia que se encuentra en grandes cantidades, ha sido objeto de estudio por los organismos reguladores y por grupos de investigación, llegando, en muchos casos y a pesar de su evidente biodegradación, a afirmarse su potencial peligro para la agricultura^{3,4}.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, en esta Memoria de Tesis se presenta un estudio del LAS a nivel nacional, con la determinación de su concentración en un gran número de depuradoras y en una gran variedad de tipos de lodos (anaerobios, aerobios, compostados, con tratamiento químico, etc.). El objeto del estudio es obtener una visión global de la concentración del LAS en las depuradoras españolas, particularizando, mediante estudio estacional, en aquellos casos de mayor interés medioambiental.

A pesar de que el LAS ha sido objeto de numerosos proyectos ambientales y de decenas de publicaciones, cabe destacar que hasta el momento de la presentación de esta Memoria de Tesis, no se había llevado a cabo un

¹ COUNCIL DIRECTIVE concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). Official Journal of the European Communities. L135/40-52. Brussels, 1991.

² COUNCIL DIRECTIVE on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (86/278/EEC). Official Journal of the European Communities. 181. 4.7.1986. p. 6–12. Brussels, 1986.

³ Schowanek D. et al, *A Risk-Based Methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture-Conceptual Framework*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 40, 227-251, 2004.

⁴ Schowanek D. et al. *Probabilistic risk assessment for LAS in sewage sludge used on agricultural soil*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 49, 245–259, 2007

estudio ambiental con una cantidad y variedad de muestras como el presentado en esta Memoria.

2.2 - Caracterización de las muestras

Las muestras de lodos analizados fueron tomadas en diferentes EDAR de España. El muestreo se llevó a cabo desde noviembre del 2005 hasta noviembre del 2006. Para algunas depuradoras con especial interés ambiental, se realizó un muestreo estacional.

En *Tabla 6.1*, se caracterizan las muestras, indicando el lugar de la depuradora, el tamaño (número de habitantes) y el tipo de tratamiento del lodo.

Tabla 6.1- Caracterización de las muestras de lodos de EDAR.

CÓDIGO	PROVINCIA	POBLACIÓN	TRAT.
ANDALUCIA			
AN1	Sevilla	132000	Anaeróbico
AN3	Málaga	575000	Anaeróbico
AN5	Sevilla	620000	Anaeróbico
AN5COM	Sevilla	“	Anaeróbico compostado
AN6	Cádiz	300000	Anaeróbico
ARAGÓN			
AR1	Zaragoza	700000	Anaeróbico
ASTURIAS			
AS2	Oviedo	85000	Estabilización química
BALEARES			
BA1	Palma	500000	Anaeróbico
BA2	Palma	“	Aeróbico
CATALUÑA			
CA2	Barcelona	230000	Anaeróbico
CA3	Barcelona	225000	Anaeróbico
CA5	Barcelona	195000	Anaeróbico
CA8	Barcelona	80000	Anaeróbico
CA10	Barcelona	“	Anaeróbico
CA12	Barcelona	“	Anaeróbico
ISLAS CANARIAS			
CC1	Tenerife	250000	Anaeróbico
CASTILLA-LEÓN			
CL1	Burgos	625000	Anaeróbico
CL2	Valladolid	570000	Anaeróbico
CL3	León	185000	Anaeróbico
CL3ST	León	“	Anaero. + sec. térmico

Tabla 6.1- Caracterización de las muestras de lodos de EDAR. (cont.)

CÓDIGO	PROVINCIA	POBLACIÓN	TRAT.
CASTILLA-LA MANCHA			
CM1	Cuenca	90000	Aeróbico
CM2	Ciudad Real	200000	Anaeróbico
COMUNIDAD VALENCIANA			
CV3	Alicante	562000	Anaeróbico
CV4	Alicante	280000	Anaeróbico
CV5	Valencia	140000	Aeróbico
EXTREMADURA			
EX2	Badajoz	143000	Anaeróbico
EX3	Mérida	50000	Aeróbico
GALICIA			
GA1	Pontevedra	400000	Anaeróbico
GA3	La Coruña	100000	Estabilización química
LA RIOJA			
LR1	Logroño	500000	Anaeróbico
MADRID			
MA2	Madrid	950000	Anaeróbico
MA7	Madrid	1000000	Anaeróbico
MA8	Madrid	350000	Anaeróbico
MA10	Madrid	320000	Anaeróbico
MURCIA			
MU1	Murcia	300000	Anaeróbico
NAVARRA			
NA3	Pamplona	85000	Aeróbico
PAÍS VASCO			
PV1	Vizcaya	850000	Incineración
PV3	Guipúzcoa	35000	Anaeróbico

En la **Figura 6.1**, sobre un mapa de España, se localizan las depuradoras muestreadas.



Figura 6.1- Localización de las plantas EDAR muestreadas.

2.3 - Tratamiento de muestra

A continuación, se describe el procedimiento operatorio llevado a cabo para determinar la cantidad de LAS presente en las muestras de lodo:

- Secado hasta pesada constante y tamización (0.25 mm de luz de malla) de las muestras de lodo de EDAR.
- Conservación en recipiente de plástico debidamente etiquetado a 4 °C.

- Pesar, dependiendo del tipo de muestra, entre 0.2 g y 1.0 g de muestra en los tubos del teflón del microondas.
- Añadir 50 mL de metanol.
- Llevar a cabo la extracción.
- Añadir, en un microreactor, 1 mL de la disolución del extracto metanólico y 1 mL de disolución del patrón interno ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Evaporar hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Diluir el extracto seco con 1 mL de disolución de agua:metanol (60:40).
- Inyección en el cromatógrafo de líquidos.

Como se puede observar, el tratamiento presenta variaciones con respecto al descrito en los capítulos anteriores, este hecho es debido a que las muestras presentaban una mayor concentración de lo esperado, por lo que para obtener resultados dentro del rango dinámico lineal descrito, se tuvo que disminuir la cantidad de muestra a tratar. Se comprobó que este cambio en el tratamiento de muestra no afecta en modo alguno en la exactitud de los resultados generados.

2.4 - Resultados

En la **Tabla 6.2**, se muestran los resultados obtenidos. Cabe resaltar que la concentración de *LAS* presentada es la concentración total, entendiendo como tal la suma de las concentraciones de cada uno de los homólogos analizados ($\text{C}_{10}\text{-C}_{13}$). Para calcular la concentración media total y la desviación estándar de la media, se analizaron dos réplicas experimentales y tres instrumentales por cada muestra para obtener un total de seis datos.

Tabla 6.2- Resultados de las muestras de lodos de EDAR.

CÓDIGO	PROVINCIA	Conc. Media (g·Kg ⁻¹)	DER (%)
ANDALUCIA			
AN1	Sevilla	11.50	1.35
AN3	Málaga	6.46	2.18
AN5	Sevilla	7.09	1.32
AN5COM	Sevilla	1.81	1.69
AN6	Cádiz	9.28	1.78
ARAGÓN			
AR1	Zaragoza	2.27	2.39
ASTURIAS			
AS2	Oviedo	0.85	2.67
BALEARES			
BA1	Palma	15.70	2.78
BA2	Palma	0.06	1.92
CATALUÑA			
CA2	Barcelona	6.92	0.98
CA3	Barcelona	20.03	1.45
CA5	Barcelona	7.51	2.12
CA8	Barcelona	8.53	0.78
CA10	Barcelona	5.96	1.67
CA12	Barcelona	11.96	2.89
ISLAS CANARIAS			
CC1	Tenerife	13.10	1.32
CASTILLA-LEÓN			
CL1	Burgos	3.70	2.35
CL2	Valladolid	3.95	1.78
CL3	León	3.00	1.40
CL3ST	León	1.14	1.56

Tabla 6.2- Resultados de las muestras de lodos de EDAR. (cont.)

CÓDIGO	PROVINCIA	Conc. Media (g·Kg ⁻¹)	DER (%)
CASTILLA-LA MANCHA			
CM1	Cuenca	0.07	0.65
CM2	Ciudad Real	3.81	1.32
COMUNIDAD VALENCIANA			
CV3	Alicante	19.10	2.89
CV4	Alicante	26.33	1.87
CV5	Valencia	0.23	2.56
EXTREMADURA			
EX2	Badajoz	0.20	1.34
EX3	Mérida	4.96	2.56
GALICIA			
GA1	Pontevedra	4.52	1.23
GA3	La Coruña	0.35	1.67
LA RIOJA			
LR1	Logroño	2.30	2.79
MADRID			
MA2	Madrid	4.00	1.89
MA7	Madrid	5.02	1.67
MA8	Madrid	1.99	1.35
MA10	Madrid	4.50	2.65
MURCIA			
MU1	Murcia	8.78	2.45
NAVARRA			
NA3	Pamplona	1.75	2.13
PAÍS VASCO			
PV1	Vizcaya	4.25	2.71
PV3	Guipúzcoa	0.71	1.63

Del mismo modo, en la **Tabla 6.3**, se muestran los resultados de los lodos analizados de forma estacional. La primera toma se refiere al período comprendido entre noviembre 2005 hasta enero del 2006. La segunda toma, por su parte, se realizó entre febrero y mayo del 2006. Entre junio y agosto del 2006 se realizó la tercera toma, y finalmente desde septiembre a noviembre del 2006 se tomó la cuarta.

Tabla 6.3- Resultados de las muestras estacionales de lodos de EDAR.

	[LAS] (g·kg ⁻¹)					
	1T	DER (%)	2T-3T	DER (%)	4T	DER (%)
AN1	11.5	1.35			8.50	1.67
AN5COM			1.80	1.69	1.40	2.23
CA3	20.3	1.45	16.80	2.17		
CL1	3.70	2.35			2.20	1.43
CL2	4.00	1.78			4.50	1.78
CL3	3.00	1.40			2.50	1.34
CV4			26.30	1.87	13.5	1.29
MA2	4.00	1.89	3.40	1.35	3.10	2.45

En la **Figura 6.2**, se muestra el cromatograma estándar para una muestra de lodo de EDAR.

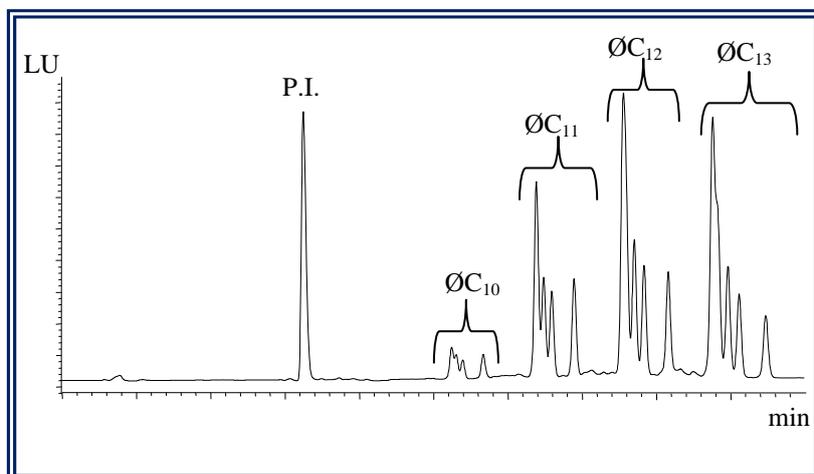


Figura 6.2- Cromatograma estándar obtenido para un lodo de EDAR.

En las **Tablas 6.4 y 6.5**, se muestran el porcentaje promedio de cada homólogo del *LAS* para muestras de lodos de EDAR y el porcentaje en una muestra patrón comercial de *LAS*.

Tabla 6.4- Porcentaje promedio del *LAS* en muestras de lodos de EDAR.

HOMÓLOGO DEL <i>LAS</i>	PORCENTAJE (%)
ØC ₁₀	4.8
ØC ₁₁	24.9
ØC ₁₂	36.4
ØC ₁₃	33.9

Tabla 6.5- Porcentaje promedio del LAS en una muestra patrón comercial.

HOMÓLOGO DEL LAS	PORCENTAJE (%)
ØC_{10}	14.1
ØC_{11}	31.3
ØC_{12}	30.8
ØC_{13}	23.8

Cabe resaltar que se determinó, en las muestras analizadas, un mayor porcentaje de los homólogos del LAS con cadena lineal más larga, eso es debido a que el LAS “pesado” tiene una mayor tendencia a precipitar en presencia de sales.

2.5 - Tratamiento estadístico

Los resultados obtenidos en el apartado anterior y las variables conocidas fueron tratadas estadísticamente de manera conjunta, con objeto de estudiar posibles relaciones entre las mismas, y de este modo, poder establecer conclusiones generales acerca del comportamiento ambiental del LAS en los lodos de EDAR.

Las variables estudiadas fueron:

- La concentración de LAS, la cual se dividió en cuatro variables conforme a los cuatro homólogos mayoritarios del LAS. Existiendo, por tanto, cuatro datos para cada muestra analizada.
- Número de habitantes: un dato por cada muestra analizada.

- Dureza: se dividió en dos niveles; 0 para muestras provenientes de ciudades cuya *dureza* del agua es alta, y 1 para muestras con dureza baja (*blanda*). La división se realizó de acuerdo al mapa nacional de durezas de agua que se muestra en la **Figura 6.3**. Las zonas más oscuras corresponden a zonas con dureza alta y las zonas más claras a regiones con dureza baja.



Figura 6.3- Mapa de España sobre la dureza del agua.

- Tratamiento: Teniendo en cuenta que el 70% de las muestras procedían de tratamientos anaeróbicos, se optó por dividir la variable en dos niveles: 0 para muestras anaerobias, y 1 para el resto de tratamientos.

En resumen, se estudiaron siete variables para un total de 47 muestras, las cuales fueron tratadas de manera conjunta mediante el programa estadístico Minitab15.

El primer tratamiento realizado fue estudiar las relaciones entre las concentraciones de los homólogos, con objeto de reducir el número de datos. Debido a la complejidad y al número de muestras tratadas, se optó por utilizar como herramienta estadística el *Análisis por Componentes Principales* (PCA).

En la **Tabla 6.6**, se muestran los resultados obtenidos mediante el tratamiento estadístico.

Tabla 6.6- Análisis por componentes principales.

HOMÓLOGO DEL LAS	PC1	PC2
$\emptyset C_{10}$	0.499	0.845
$\emptyset C_{11}$	0.501	-0.101
$\emptyset C_{12}$	0.500	-0.361
$\emptyset C_{13}$	0.500	-0.380
PROPORCIÓN (%)	99.6	0.3

Los valores de PC1 y PC2 para cada homólogo, son el valor que tiene cada uno de ellos en cada una de las dos componentes mayoritarias estimadas por el modelo. Del mismo modo, la proporción es la cantidad de variabilidad total del modelo, medido en porcentaje, que es capaz de explicar cada componente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir, en primer lugar, que la PC1 es capaz de explicar el 99.6% de la variabilidad del modelo, siendo la PC2 despreciable con tan sólo el 0.3%. De la misma manera, se observa que la PC1 está compuesta, de manera casi idéntica, por los mismos valores para cada homólogo, indicando una estrecha relación entre las concentraciones de los diferentes homólogos (combinación lineal). Por lo que, conociendo la concentración de uno de los homólogos, se puede estimar el resto de las concentraciones. La estrecha relación entre las concentraciones de los homólogos en lodos de EDAR es debida a su naturaleza sintética, ya que su producción suele tener márgenes muy estrechos, y las diferencias en el porcentaje de cada uno de los homólogos entre diferentes lotes de producción suelen ser despreciables.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se seleccionó como variable respuesta para los siguientes tratamientos estadísticos la columna que contenía los *scores* o valores generados por la PC1 para cada una de las muestras analizadas.

Tras la selección de la variable respuesta, se procedió a establecer relaciones estadísticas entre la columna de *scores* y las demás variables estudiadas. La herramienta estadística utilizada fue el análisis de la varianza (ANOVA). La robustez y exactitud de ANOVA permitió analizar, de manera independiente, la variable respuesta frente a la dureza, al tipo de tratamiento y al número de habitantes.

A la hora de interpretar los resultados estadísticos, se tuvo en cuenta que para un nivel de confianza del 95%, valores del parámetro estadístico p menores del 0.05 se consideraban estadísticamente significativos. Del

mismo modo, valores de p mayores a 0.05 se estimaron como no significativos.

De acuerdo a lo comentado en el párrafo anterior, a través de la significancia o no del valor p calculado para pares de variables, se pudo establecer conclusiones acerca de la influencia de las variables estudiadas en la variable respuesta, y por ende, en los valores de concentración de LAS obtenidos.

El primer paso fue normalizar y transformar mediante la función *box-cox* la variable respuesta, con objeto de aplicar de manera apropiada el modelo estadístico planteado por ANOVA.

Tras la normalización y posterior transformación, se procedió al cálculo del valor p para cada pareja de variables (variable respuesta frente a dureza, variable respuesta frente a tratamiento y variable respuesta frente a habitantes).

Cabe destacar que, para el caso de la variable habitantes, no se pudo establecer el modelo matemático ANOVA, ya que las gráficas de los residuos obtenidas no se ajustaban al principio de aleatoriedad en la distribución. Por tanto, para evaluar la significancia de la variable habitantes, se optó por usar un tratamiento estadístico no paramétrico denominado el test de *Kruskal-Wallis*. El significado del valor de p , obtenido mediante la aplicación de este test, era similar al estimado mediante ANOVA, por lo que nos sirvió para estimar la significancia de la variable habitantes en la variable respuesta.

En la **Tabla 6.7**, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de las herramientas estadísticas:

Tabla 6.7- Análisis estadístico.

VARIABLES	VALOR DE P	CONCLUSIÓN
Respuesta vs habitantes	0.187	No significativo
Respuesta vs dureza	0.004	Significativo
Respuesta vs tratamiento	0.000	Significativo

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto la dureza del agua como el tipo de tratamiento usado tienen un peso significativo en el valor de *LAS* encontrado en los lodos de EDAR. Sin embargo, la concentración de *LAS* no depende en modo alguno del número de habitantes de la zona donde se encuentra la EDAR.

2.6 - Discusión

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y los resultados obtenidos, se sacaron las siguientes conclusiones:

- Para el mismo tipo de tratamiento del lodo, los mayores valores de concentración de *LAS* se encontraron en las zonas con mayor dureza del agua, es decir, las zonas litorales del mediterráneo como Alicante ($26.30 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $19.10 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) o Barcelona ($20.03 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

- De manera inversa, las zonas con menor concentración de sales en el agua son las que presentan menor concentración de *LAS* en sus lodos de EDAR, es decir, el centro y el norte de la península, Madrid ($1.90 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), Castilla León ($2.20 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y $2.70 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y Logroño ($2.30 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
- Por lo tanto, basándose en lo anteriormente mencionado y en las conclusiones obtenidas durante el tratamiento estadístico de los resultados, se concluye que por encima de otras características como el tamaño (número de habitantes) de la depuradora, el factor principal que determina la concentración de *LAS* en los lodos es la concentración de sales en el agua. Este hecho se explica, como se comentó en los capítulos anteriores, por la tendencia a precipitar que tiene el *LAS* en presencia, fundamentalmente, de sales cálcicas y magnésicas.
- Del mismo modo, se detectó un comportamiento dispar, en cuanto a la concentración de *LAS*, entre lodos aerobios y lodos anaerobios, presentando los lodos aerobios, para zonas con similar dureza del agua, concentraciones muy inferiores a las determinadas para lodos anaerobios. Ejemplos son los encontrados en Baleares ($0.06 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $15.70 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), Madrid ($0.07 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $3.81 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y la Comunidad de Valencia ($0.23 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $26.33 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Estos resultados demuestran la rápida degradación del *LAS* en condiciones aerobias, siendo mucho más lenta su degradación bajo condiciones anaerobias.

-
- Para lodos anaerobios tratados en la misma planta EDAR, el proceso de compostaje reduce la concentración de *LAS*, como por ejemplo en Sevilla ($1.81 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $7.09 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
 - De manera similar, para el mismo tipo de lodo, un proceso de secado térmico posterior al tratamiento anaerobio favorece la disminución de la concentración de *LAS* en el lodo. Un ejemplo de este tratamiento es León ($1.14 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $3.00 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
 - Los lodos tratados mediante estabilización química presentan menores concentraciones de *LAS* que los tratados en condiciones anaerobias para provincias con similar dureza del agua. Por ejemplo en Galicia ($0.35 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $4.52 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
 - Finalmente, en cuanto a las muestras analizadas estacionalmente, se observan variaciones; sin embargo, destaca, por encima de cualquier otra, los valores detectados en la planta EDAR de Alicante ($26.3 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $13.50 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Esta significativa variación se pudo deber al cambio poblacional, provocado durante los meses de verano en un zona con especial interés turístico.

3.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN LODOS DE EDAR

3.1 - Contextualización

La carencia de estudios sobre el comportamiento ambiental del jabón en plantas EDAR es evidente, ya que según se describió en la introducción, *Apartado 2.4.6*, el estudio ambiental del jabón se resume en un ensayo de monitorización en una planta EDAR. En dicho estudio, para evaluar la monitorización, se llevó a cabo un balance de materias, el cual se basó en el análisis de la cantidad de jabón en el caudal de entrada de la depuradora, del lodo de EDAR resultante y del caudal de salida de la planta.

Desde el punto de vista analítico, existen sólo dos artículos, *Capítulo 1, apartado 2.5.2*, que hacen referencia al análisis de jabón en lodos de EDAR. Con los resultados obtenidos por estas metodologías, no se pudieron derivar conclusiones generales, ya que se analizaron un número demasiado pequeño de muestras como para ser consideradas representativas.

La concentraciones encontradas de jabón en estas matrices fueron muy elevadas (del orden de $\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), debido a que, de la misma manera que el LAS, el jabón tiene tendencia a precipitar, fundamentalmente, en presencia de sales cálcicas y magnésicas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en este capítulo se propone llevar a cabo un estudio lo suficientemente representativo en número y en diversidad como para sacar conclusiones generales acerca de la

concentración de jabón en lodos de EDAR y, por ende, de su comportamiento ambiental en las plantas EDAR.

3.2 - Caracterización de las muestras

Al igual que el *LAS*, las muestras de lodos analizados fueron tomadas en diferentes plantas EDAR de España. El muestreo se llevó a cabo desde noviembre del 2005 hasta noviembre del 2006. Para algunas depuradoras, se realizó un muestreo estacional. Sin embargo, debido a la escasez de cantidad de muestra, se analizaron un número menor de muestras que para el *LAS*, seleccionado aquellos lodos con un mayor interés medioambiental.

En la *Tabla 6.8*, se caracterizan las muestras, indicando el lugar de la depuradora, el tamaño (número de habitantes) y el tipo de tratamiento del lodo.

Tabla 6.8- Caracterización de las muestras de lodos de EDAR.

CÓDIGO	PROVINCIA	POBLACIÓN	TRAT.
ANDALUCIA			
AN1	Sevilla	132000	Anaeróbico
AN5	Sevilla	620000	Anaeróbico
AN5COM	Sevilla	620000	Anaeróbico compostado
AN6	Cádiz	300000	Anaeróbico
ARAGÓN			
AR1	Zaragoza	700000	Anaeróbico
ASTURIAS			
AS2	Oviedo	85000	Estabilización química
BALEARES			
BA1	Palma	500000	Anaeróbico
BA2	Palma	"	Aeróbico
CATALUÑA			
CA3	Barcelona	225000	Anaeróbico
CA12	Barcelona	"	Anaeróbico
ISLAS CANARIAS			
CC1	Tenerife	250000	Anaeróbico
CASTILLA-LEÓN			
CL3	León	185000	Anaeróbico
CL3ST	León	185000	Anaero. + secado térmico
CASTILLA-LA MANCHA			
CM2	Ciudad Real	200000	Anaeróbico
COMUNIDAD VALENCIANA			
CV3	Alicante	562000	Anaeróbico
CV4	Alicante	280000	Anaeróbico

Tabla 6.8- Caracterización de las muestras de lodos de EDAR. (cont.)

CÓDIGO	PROVINCIA	POBLACIÓN	TRAT.
EXTREMADURA			
EX2	Badajoz	143000	Anaeróbico
EX3	Mérida	50000	Aeróbico
GALICIA			
GA1	Pontevedra	400000	Anaeróbico
LA RIOJA			
LR1	Logroño	500000	Anaeróbico
MADRID			
MA2	Madrid	950000	Anaeróbico
MA7	Madrid	1000000	Anaeróbico
MA10	Madrid	320000	Anaeróbico
NAVARRA			
NA3	Pamplona	85000	Aeróbico
PAÍS VASCO			
PV3	Guipúzcoa	35000	Anaeróbico

3.3 - Tratamiento de muestra

A continuación, se describe el procedimiento operatorio llevado a cabo para determinar la cantidad de jabón presente en las muestras de lodos:

- Secado hasta pesada constante y tamización (0.25 mm de luz de malla) de las muestras de lodo de EDAR.
- Conservación en recipiente de plástico debidamente etiquetado a 4 °C.

- Pesar, dependiendo del tipo de muestra, entre 0.1 g y 1.0 g de muestra en los tubos del teflón del microondas.
- Añadir 50 mL de éter de petróleo y llevar a cabo la extracción con el microondas.
- Añadir 50 mL de agua, 50 mg de EDTA-3K y 25 mg de K_2CO_3 . Calentar durante 4 h a 105 °C.
- Añadir 50 mL de metanol. Extracción en el microondas.
- En un microreactor, pipetear 2 mL del extracto metanólico y 1 mL de disolución de patrón interno ($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Evaporar hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Añadir 100 μL de disolución de BrMMC (0.2% m/m en acetonitrilo) y 100 μL de disolución de éter corona (0.5% m/m en acetonitrilo).
- Calentar a 105 °C durante 5 minutos.
- Añadir 3.8 mL de agua. Volumen final de 4 mL.
- Inyección en el cromatógrafo de líquidos. Detección fluorescente.

Como se puede observar, el tratamiento presenta variaciones con respecto al descrito en los capítulos anteriores, este hecho es debido a que las muestras presentaban una mayor concentración de lo esperado, por lo que para obtener resultados dentro del rango dinámico lineal descrito, se tuvo que disminuir la cantidad de muestra a tratar. Se comprobó que este cambio en el tratamiento de muestra no afecta en modo alguno en la exactitud de los resultados generados.

3.4 - Resultados

En la **Tabla 6.9**, se muestran los resultados obtenidos. Cabe resaltar que la concentración de jabón presentada, al igual que la de LAS, es la concentración total, entendiéndose como tal la suma de las concentraciones de cada uno de los homólogos analizados (C₁₂-C_{18:1}). Para calcular la concentración media total y la desviación estándar de la media, se analizaron dos réplicas experimentales y tres instrumentales por cada muestra para obtener un total de seis datos.

Tabla 6.9- Resultados de las muestras de lodos de EDAR.

CÓDIGO	PROVINCIA	Conc. Media (g·Kg⁻¹)	DER (%)
ANDALUCIA			
AN1	Sevilla	7.34	2.34
AN5	Sevilla	8.02	1.89
AN5COM	Sevilla	2.49	2.89
AN6	Cádiz	9.88	3.02
ARAGÓN			
AR1	Zaragoza	83.34	3.32
ASTURIAS			
AS2	Oviedo	46.55	3.45
BALEARES			
BA1	Palma	9.71	3.67
BA2	Palma	9.54	3.89
CATALUÑA			
CA3	Barcelona	46.25	3.12
CA12	Barcelona	11.87	3.09
ISLAS CANARIAS			
CC1	Tenerife	6.52	3.76

Tabla 6.9- Resultados de las muestras de lodos de EDAR. (cont.)

CÓDIGO	PROVINCIA	Conc. Media (g·Kg ⁻¹)	DER (%)
CASTILLA-LEÓN			
CL3	León	17.57	2.67
CL3ST	León	12.34	2.89
CASTILLA-LA MANCHA			
CM2	Ciudad Real	7.47	2.56
COMUNIDAD VALENCIANA			
CV3	Alicante	190.36	3.33
CV4	Alicante	11.53	3.54
EXTREMADURA			
EX2	Badajoz	5.34	2.13
EX3	Mérida	13.36	2.89
GALICIA			
GA1	Pontevedra	27.65	1.99
LA RIOJA			
LR1	Logroño	10.93	3.71
MADRID			
MA2	Madrid	15.47	3.06
MA7	Madrid	8.65	3.12
MA10	Madrid	13.41	3.56
NAVARRA			
NA3	Pamplona	74.80	3.34
PAÍS VASCO			
PV3	Guipúzcoa	11.99	3.67

Del mismo modo, en la *Tabla 6.10*, se muestran los resultados de los lodos analizados de forma estacional. La primera toma se refiere al período comprendido entre noviembre 2005 hasta enero del 2006. La

segunda toma, por su parte, se llevó a cabo entre febrero y mayo del 2006. Entre junio y agosto del 2006 se realizó la tercera toma, y finalmente desde septiembre a noviembre del 2006 se tomó la cuarta.

Tabla 6.10- Resultados de las muestras estacionales de lodos de EDAR.

	[LAS] ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)					
	1T	DER (%)	2T-3T	DER (%)	4T	DER (%)
CV4			26.57	3.87	11.50	3.54

En la **Figura 6.4**, se muestra el cromatograma estándar para una muestra de lodo de EDAR. Cabe resaltar que existía un mayor porcentaje del jabón con cadena lineal más larga, eso es debido a que el jabón “pesado” tiene una mayor tendencia a precipitar en presencia de sales.

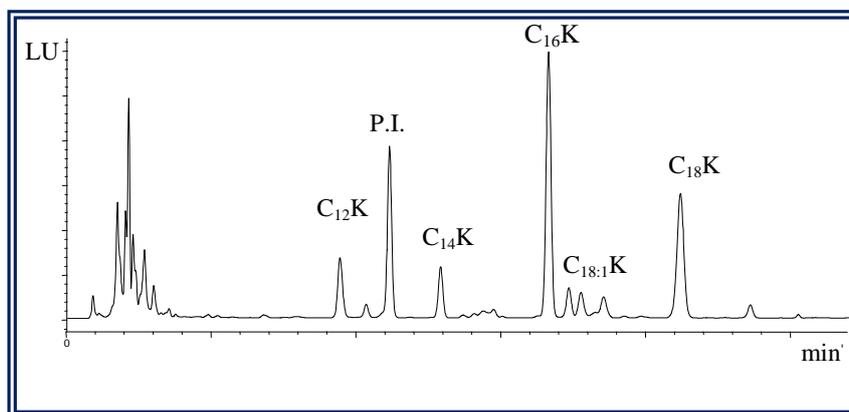


Figura 6.4- Cromatograma estándar obtenido para un lodo de EDAR.

En la **Tabla 6.11**, se muestran el porcentaje promedio de cada tipo de jabón para muestras de lodos de EDAR.

Tabla 6.11- Porcentaje promedio del jabón en muestras de lodos de EDAR.

Jabón	Porcentaje (%)
C ₁₂	10.2
C ₁₄	6.8
C ₁₆	47.7
C _{18:1}	4.2
C ₁₈	31.1

3.5 - Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico usado es similar al planteado el en **Apartado 2.5** del presente Capítulo. Del mismo modo, las variables estudiadas son idénticas a las seleccionadas para el caso del *LAS*, salvo en el caso de la concentración, que para el jabón está dividida en cinco partes, de acuerdo a los cinco diferentes tipos de jabón analizados (C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, C_{18:1}).

En la **Tabla 6.12**, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el análisis por componentes principales:

Tabla 6.12- Análisis por componentes principales.

JABÓN	PC1	PC2
C ₁₂	0.418	-0.501
C ₁₄	0.493	0.113
C ₁₆	0.494	-0.076
C ₁₈	0.489	-0.149
C _{18:1}	0.314	0.842
PROPORCIÓN (%)	78.4	16.6

A diferencia del *LAS*, en el cual sólo se apreciaba una componente principal mayoritaria, en el caso del jabón se pueden apreciar dos componentes principales con peso estadístico.

La PC1, está compuesta, en proporción parecida, por el jabón tipo C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈, y en menor medida de jabón tipo C_{18:1}. Por su parte, la PC2 está compuesta, de manera principal, por el jabón C_{18:1}.

A la vista de los resultados obtenidos, se optó por llevar a cabo el posterior análisis AVONA con dos variables respuesta (valores de PC1 y valores de PC2). Con objeto de simplificar las conclusiones, se estableció la aproximación de que los valores de la PC1 estaba compuestos, de manera similar, por todos los analitos excepto el jabón tipo C_{18:1}, y que la PC2, por su parte, respondía a los valores generados por el jabón tipo C_{18:1}.

Por las mismas razones que las expuestas en el *Apartado 2.5* del presente Capítulo, no se pudo establecer el tratamiento ANOVA para la variable habitantes con ninguna de las variables respuesta, por lo que se optó por

usar el test no paramétrico de *Kruskal-Wallis*. De igual manera, el test ANOVA no presentaba buenos resultados con la variable respuesta PC2, por lo que se usó el test de *Kruskal-Wallis* para calcular el valor p . En los demás casos, se pudo establecer el modelo ANOVA sin ningún problema.

En la **Tabla 6.13**, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar los tratamientos estadísticos.

Tabla 6.13- Análisis estadístico.

VARIABLES	VALOR DE P	CONCLUSIÓN
PC1 vs habitantes	0.223	No significativo
PC1 vs dureza	0.009	Significativo
PC1 vs tratamiento	0.830	No significativo
PC2 vs habitantes	0.567	No significativo
PC2 vs dureza	0.584	No significativo
PC2 vs tratamiento	0.339	No significativo

Teniendo en cuenta los valores de p obtenidos, sólo la dureza es significativa en la concentración de jabón en lodos de EDAR, siendo el resto de variables no significativas.

3.6 - Discusión

A la vista de los resultados obtenidos, se sacaron las siguientes conclusiones:

- Los valores más altos de jabón se localizaron en el centro-norte de España; como por ejemplo, Barcelona ($46.25 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)

¹), León (17.57 g·Kg⁻¹), Alicante (190.36 g·Kg⁻¹), Pontevedra (27.65 g·Kg⁻¹) y Pamplona (74.80 g·Kg⁻¹).

- Del mismo modo, los valores más bajos se detectaron en el sur de la península y en las islas; como por ejemplo: Sevilla (7.34 g·Kg⁻¹), Tenerife (6.52 g·Kg⁻¹), Badajoz (5.34 g·Kg⁻¹) y Ciudad Real (7.47 g·Kg⁻¹).
- Teniendo en cuenta las conclusiones anteriores y, con excepción de la dureza, la falta de significancia de las variables estudiada en el apartado del tratamiento estadístico, se dedujo la posibilidad de que la temperatura fuera el factor que más influía en la concentración de jabón en los lodos de EDAR, sobre todo basándose en la diferencia existente en la temperatura entre el norte y el sur de España, y la manifiesta insolubilidad del jabón en agua a temperaturas por debajo de 20 °C.
- No se observó diferencia significativa en la concentración de jabón entre lodos aerobios y anaerobios para provincias similares. Un ejemplo es Palma de Mallorca (9.71 g·Kg⁻¹ frente a 9.54 g·Kg⁻¹).
- Cabe destacar que el lodo estabilizado químicamente presenta una concentración de jabón muy elevada (Oviedo 46.55 g·Kg⁻¹).

- Se detectaron diferencias significativas entre un mismo lodo compostado y sin compostar, favoreciendo el proceso de compostaje la eliminación de jabón ($8.02 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $2.49 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
- Del mismo modo, se comprobó que el proceso de secado posterior al tratamiento anaerobio favorecía la desaparición de jabón ($17.57 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $12.34 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).
- Finalmente, para el lodo estudiado de manera estacional, se detectó una clara variación en la concentración de jabón entre la temporada turística ($26.57 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y el resto del año ($11.5 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

4.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL JABÓN Y EL LAS

Se compararon los resultados obtenidos por los analitos objetos de estudio, y se detectó que a pesar de ser tensioactivos de la misma familia (aniónicos), tanto las concentraciones como los patrones seguidos en su comportamiento eran sensiblemente diferentes para ambas sustancias.

Cabe destacar que la comparación se llevó a cabo con las variables disponibles (concentración de los analitos, población, dureza del agua y tratamiento de los lodos). Por falta de datos, no se tuvieron en cuenta factores como volumen de agua tratado al día, tiempos de parada, temperatura, etc. Los cuales pudieron haber influido de manera notable en los resultados finales.

A continuación, se resumen las principales conclusiones que se sacaron de la comparación:

- Las concentraciones de jabón determinadas eran significativamente mayores que las halladas para el LAS, siendo los máximos ($190.36 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente $26.33 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y los mínimos ($2.46 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $0.06 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) para cada analito diametralmente dispares. Este fenómeno pudo deberse al mayor consumo del jabón y a su mayor tendencia a precipitar.
- Tanto la concentración del LAS como la de jabón se veían muy influenciadas por la cantidad de sales presentes en el agua, aunque en caso del jabón se observó una tendencia a encontrar concentraciones elevadas en el centro-norte de España, por lo que se planteó la hipótesis de que la temperatura podría ser un factor a considerar en los resultados finales.
- Al contrario que en el caso del jabón, se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de LAS entre un lodo aerobio y otro anaerobio.
- De igual manera, se detectó un comportamiento dispar en presencia de la estabilización química, determinándose concentraciones pequeñas para el LAS ($0.85 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y concentraciones altas para el jabón ($46.55 \text{ g}\cdot\text{Kg}^{-1}$).

- Para finalizar, se observó un comportamiento similar de ambos tensioactivos frente al compostaje, el tratamiento químico y al estudio estacional.

CAPÍTULO 7
DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN
SEDIMENTOS Y TIERRA

1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, se presentan los resultados obtenidos tras la aplicación de las metodologías propuestas para la determinación de *LAS* y jabón en sedimentos marinos y de jabón en tierra.

En la primera parte se aborda la determinación de *LAS* en sedimentos marinos, desarrollándose, en el primer apartado, una contextualización del proceso de determinación. Al igual que en el caso de la determinación en lodos de EDAR, se desarrollan en los apartados siguientes la caracterización de la muestras, la presentación de los resultados, el tratamiento estadístico, y, para finalizar, en el último apartado, se expone una discusión de los resultados obtenidos, presentando una serie de conclusiones finales acerca del comportamiento del *LAS* en las muestras de sedimentos recogidas.

En la segunda parte, se expone, de forma parecida al *LAS*, la determinación del jabón en sedimentos. La estructura seguida es muy parecida a la del *LAS*, empezando por una pequeña introducción o contextualización, seguida de una descripción de las muestras analizadas y, terminando con una presentación y discusión de los resultados.

En la tercera parte, teniendo en cuenta todos los resultados presentados, se desarrolla una comparativa entre los dos tipos de analitos estudiados, proponiendo, al final, unas conclusiones generales acerca del comportamiento del jabón y del *LAS* en las muestras tratadas.

Para finalizar, en la última parte, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar la metodología propuesta para la determinación de jabón en muestras de tierra. El desarrollo seguido es similar al expuesto para sedimentos marinos.

2.- DETERMINACIÓN DE *LAS* EN SEDIMENTOS MARINOS

2.1 - Contextualización

Existen varias publicaciones que hacen referencia a la determinación de *LAS* en sedimentos marinos^{1,2,3,4} Por lo que, gracias a estos estudios, se

¹ Rubio J.A., González-Mazo E., Gómez-Parra A. *Sorption of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) on marine sediments*. Marine Chemistry 54: 171-177, 1996.

² DelValls T.A., Forja J.M., González-Mazo E., Gómez-Parra A. *Determining contamination sources in marine sediments using multivariate analysis*. Trends in Analytical Chemistry 17: 181-192, 1998.

³ León VM, González-Mazo E, Gómez-Parra A. *Handling of marine and estuarine samples for the determination of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids*. Journal of Chromatography A 889: 211-219, 2000.

pueden obtener conclusiones generales del comportamiento ambiental del LAS en sedimentos marinos.

A pesar de estos estudios, hasta la fecha, no se había llevado a cabo un ensayo estacional en varios puntos de muestreo.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y para completar los estudios anteriores sobre el LAS en sedimentos marinos, se presenta, a continuación, un ensayo estacional realizado en varios puntos cercanos a un emisario marino.

2.2 - Caracterización de las muestras

Las muestras de sedimentos analizadas fueron tomadas al Sur, al Este, al Oeste y debajo de la boca de dos emisarios, correspondientes a dos plantas depuradoras, localizadas en Almería y Roquetas de Mar. Cabe destacar que los emisarios estaban situados a 150 m (Almería) y a 200 m (Roquetas) de la costa. En la *Figura 7.1*, se muestra los puntos de muestreo. De acuerdo a la carta marina, la profundidad media de las muestras colectadas fue de 150 m.

⁴ González-Mazo E, Gómez-Parra A. *Monitoring anionic surfactants (LAS) and their intermediate degradation products in the marine sediments*. Trends in Analytical chemistry 15: 375-380, 1996.



Figura 7.1- Localización de los puntos muestreados.

Se obtuvieron seis muestras estacionales de cada punto, las cuales estuvieron comprendidas entre mayo del 2002 y julio del 2003. En la **Tabla 7.1**, se detalla el estudio estacional realizado y la nomenclatura usada para caracterizar el lugar de muestreo.

Tabla 7.1- Muestras de sedimentos marinos.

PRIMER MUESTREO: MAYO 2002	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₂	(E ₂ .B) ₂
(E ₁ .E) ₂	(E ₂ .E) ₂
(E ₁ .S) ₂	(E ₂ .S) ₂
(E ₁ .O) ₂	(E ₂ .O) ₂
SEGUNDO MUESTREO: JUNIO 2002	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₃	(E ₂ .B) ₃
(E ₁ .E) ₃	(E ₂ .E) ₃
(E ₁ .S) ₃	(E ₂ .S) ₃
(E ₁ .O) ₃	(E ₂ .O) ₃
TERCER MUESTREO: JULIO 2002	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₄	(E ₂ .B) ₄
(E ₁ .E) ₄	(E ₂ .E) ₄
(E ₁ .S) ₄	(E ₂ .S) ₄
(E ₁ .O) ₄	(E ₂ .O) ₄
CUARTO MUESTREO: ENERO 2003	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₅	(E ₂ .B) ₅
(E ₁ .E) ₅	(E ₂ .E) ₅
(E ₁ .S) ₅	(E ₂ .S) ₅
(E ₁ .O) ₅	(E ₂ .O) ₅

Tabla 7.1- Muestras de sedimentos marinos. (cont.)

QUINTO MUESTREO: ABRIL 2003	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₆	(E ₂ .B) ₆
(E ₁ .E) ₆	(E ₂ .E) ₆
(E ₁ .S) ₆	(E ₂ .S) ₆
(E ₁ .O) ₆	(E ₂ .O) ₆
SEXTO MUESTREO: JULIO 2003	
<i>Emisario 1</i>	<i>Emisario 2</i>
(E ₁ .B) ₇	(E ₂ .B) ₇
(E ₁ .E) ₇	(E ₂ .E) ₇
(E ₁ .S) ₇	(E ₂ .S) ₇
(E ₁ .O) ₇	(E ₂ .O) ₇

2.3 - Tratamiento de muestra

A continuación, se describe el procedimiento operatorio llevado a cabo para determinar el contenido de LAS presente en las muestras de sedimentos marinos:

- Secado hasta pesada constante y tamización (0.25 mm de luz de malla) de las muestras de sedimentos marinos.
- Conservación en recipiente de plástico debidamente etiquetado a 4 °C.
- Pesar, dependiendo del tipo de muestra, 5 g de muestra en los tubos del teflón del microondas.
- Añadir 50 mL de metanol.
- Llevar a cabo la extracción.

- Añadir, en un microreactor, 10 mL de la disolución del extracto metanólico y 1 mL de disolución del patrón interno ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Evaporar hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Diluir el extracto seco con 1 mL de disolución de agua:metanol (60:40).
- Inyección en el cromatógrafo de líquidos.

2.4 - Resultados

En la **Tabla 7.2**, se muestran los resultados obtenidos. Cabe resaltar que la concentración de LAS presentada es la concentración total, entendiendo como tal la suma de las concentraciones de cada uno de los homólogos analizados (C_{10} - C_{13}). Para calcular la concentración media total y la desviación estándar de la media, se analizaron dos réplicas experimentales y tres instrumentales por cada muestra para obtener un total de seis datos.

Tabla 7.2- Resultados de las muestras de sedimentos marinos.

PRIMER MUESTREO: MAYO 2002					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₂	1.18	1.35	(E ₂ .B) ₂	0.89	1.78
(E ₁ .E) ₂	0.04	2.18	(E ₂ .E) ₂	< L.C.	-
(E ₁ .S) ₂	0.14	1.63	(E ₂ .S) ₂	0.23	1.24
(E ₁ .O) ₂	0.09	1.24	(E ₂ .O) ₂	0.12	1.43
SEGUNDO MUESTREO: JUNIO 2002					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₃	70.90	2.07	(E ₂ .B) ₃	123.60	2.34
(E ₁ .E) ₃	0.61	1.89	(E ₂ .E) ₃	0.08	1.98
(E ₁ .S) ₃	0.03	1.67	(E ₂ .S) ₃	0.12	2.01
(E ₁ .O) ₃	0.23	1.32	(E ₂ .O) ₃	0.06	2.23
TERCER MUESTREO: JULIO 2002					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₄	0.91	1.31	(E ₂ .B) ₄	1.25	2.23
(E ₁ .E) ₄	0.24	1.12	(E ₂ .E) ₄	0.34	2.67
(E ₁ .S) ₄	1.19	1.46	(E ₂ .S) ₄	1.25	1.89
(E ₁ .O) ₄	0.12	1.51	(E ₂ .O) ₄	< L.C.	-

Tabla 7.2- Resultados de las muestras de sedimentos marinos. (cont.)

CUARTO MUESTREO: ENERO 2003					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₅	5.88	2.67	(E ₂ .B) ₅	3.45	1.78
(E ₁ .E) ₅	0.14	2.01	(E ₂ .E) ₅	0.07	1.31
(E ₁ .S) ₅	0.33	2.34	(E ₂ .S) ₅	0.45	1.52
(E ₁ .O) ₅	0.25	2.11	(E ₂ .O) ₅	0.30	3.01
QUINTO MUESTREO: ABRIL 2003					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₆	40.10	2.07	(E ₂ .B) ₆	30.70	2.97
(E ₁ .E) ₆	1.02	1.76	(E ₂ .E) ₆	0.87	1.95
(E ₁ .S) ₆	9.35	1.82	(E ₂ .S) ₆	11.81	2.13
(E ₁ .O) ₆	1.99	1.91	(E ₂ .O) ₆	1.65	2.56
SEXTO MUESTREO: JULIO 2003					
<i>Emisario 1</i>			<i>Emisario 2</i>		
Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)	Muestra	Conc. (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₇	1.48	2.13	(E ₂ .B) ₇	1.70	3.12
(E ₁ .E) ₇	0.35	2.78	(E ₂ .E) ₇	0.40	2.67
(E ₁ .S) ₇	0.22	1.78	(E ₂ .S) ₇	0.22	0.97
(E ₁ .O) ₇	0.21	1.99	(E ₂ .O) ₇	0.20	1.23

En la **Figura 7.2**, se muestra el cromatograma estándar para una muestra de sedimentos marinos. Al igual que para el caso de las muestras de lodos, cabe resaltar que se encontró un mayor porcentaje de los homólogos del LAS con cadena lineal más larga, lo cual es debido a que el LAS “pesado”

tiene una mayor tendencia a precipitar en presencia de sales, siendo su proporción aún mayor que la determinada para lodos de EDAR.

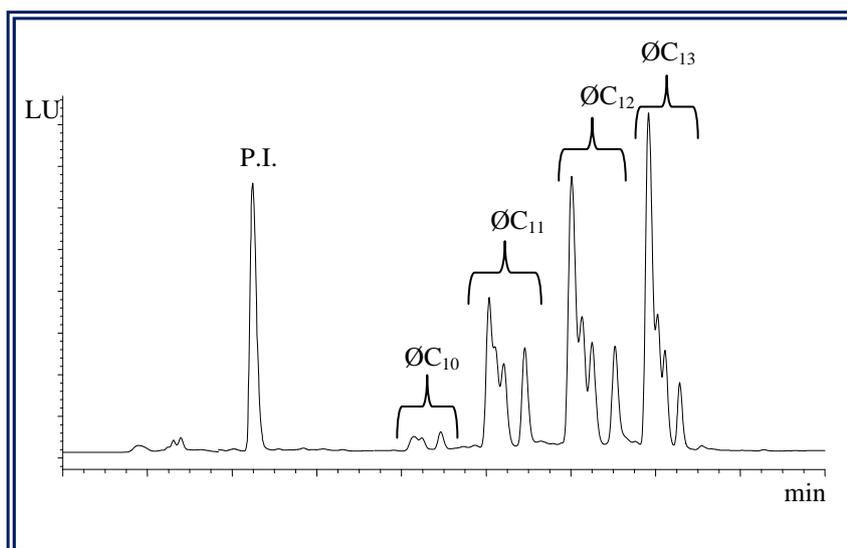


Figura 7.2- Cromatograma estándar para un sedimento marino.

En las **Tablas 7.3 y 7.4**, se muestran el porcentaje promedio de cada homólogo del LAS para muestras de sedimentos marinos y el porcentaje en una muestra patrón comercial de LAS.

Tabla 7.3- Porcentaje promedio del LAS en muestras de sedimentos marinos.

HOMÓLOGO DEL LAS	PORCENTAJE (%)
ØC ₁₀	2.5
ØC ₁₁	22.3
ØC ₁₂	35.9
ØC ₁₃	39.3

Tabla 7.4- Porcentaje promedio del LAS en una muestra patrón comercial.

HOMÓLOGO DEL LAS	PORCENTAJE (%)
ØC_{10}	14.1
ØC_{11}	31.3
ØC_{12}	30.0
ØC_{13}	23.8

2.5 - Tratamiento estadístico

El tratamiento seguido es similar al descrito en el *Capítulo 6, apartado 2.5*.

Las variables estudiadas fueron:

- La concentración de LAS, la cual se dividió en cuatro variables conforme a los cuatro homólogos mayoritarios de LAS existentes. Existiendo, por tanto, cuatro datos para cada muestra analizada.
- Punto de muestreo: se dividió en cuatro niveles; 1 para muestras tomadas en la boca del emisario; 2 para muestras tomadas al Este del emisario; 3 para muestras tomadas al Sur del emisario y 4 para muestras tomadas al Oeste del emisario.
- Toma: se dividió en seis, de acuerdo a las diferentes tomas realizadas en los mismos puntos durante diferentes meses.
- Emisario: se dividió en dos, 0 para el emisario 1 y 1 para el emisario 2.

En la **Tabla 7.5**, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el análisis por componentes principales.

Tabla 7.5- Análisis por componentes principales.

HOMÓLOGO DEL LAS	PC1	PC2
$\emptyset C_{10}$	0.478	-0.868
$\emptyset C_{11}$	0.505	0.347
$\emptyset C_{12}$	0.509	0.151
$\emptyset C_{13}$	0.506	0.322
PROPORCIÓN (%)	95.8	4.1

Los resultados y, por tanto, las conclusiones son similares a las obtenidas en el **Capítulo 6, apartado 2.5**.

Del mismo modo, se procedió a calcular los valores de p para cada pareja de variables (variable respuesta frente a punto de muestreo, variable respuesta frente a toma y variable respuesta frente a muestreo).

En el caso de los sedimentos, se aplicó de manera satisfactoria el test de ANOVA, ya que todos los residuos cumplían el principio de aleatoriedad en la distribución.

En la **Tabla 7.6**, se muestran los valores de p obtenidos.

Tabla 7.6- Análisis estadístico.

VARIABLES	VALOR DE P	CONCLUSIÓN
Respuesta vs punto de m.	0.000	Significativo
Respuesta vs toma	0.013	Significativo
Respuesta vs emisario	0.811	No significativo

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que tanto el punto de muestreo como la toma tienen un peso significativo en el valor de LAS encontrado en los sedimentos. Sin embargo, la concentración de LAS no depende en modo alguno del tipo de emisario.

2.6 - Discusión

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado anterior, se concluyó que:

- Los valores más altos de concentración de LAS se encontraron debajo de la boca de los emisarios, como por ejemplo (E₁.B)₃ con 70.96 mg·Kg⁻¹, (E₂.B)₃ con 123.6 mg·Kg⁻¹, (E₁B)₆ con 40.10 mg·Kg⁻¹ y (E₂B)₆ con 30.70 mg·Kg⁻¹.
- Del mismo modo, los valores más bajos de concentración se encontraron en los puntos muestreados al Este, al Oeste, y al Sur de la boca de los emisarios, ejemplos son (E₂E)₅ con 0.07 mg·Kg⁻¹, (E₁S)₃ con 0.03 mg·Kg⁻¹ y (E₁O)₃ con 0.06 mg·Kg⁻¹. Los valores obtenidos tenían una distribución aleatoria, ya que no se pudo determinar ninguna relación entre la

concentración y los tres puntos de muestreo, alternándose los valores mínimos entre las tres zonas (Este, Oeste y Sur).

- Cabe resaltar que las muestras tomadas en un mismo muestreo pero en emisarios diferentes presentaban resultados con orden de magnitud parecido. Ejemplos son $(E_1B)_6$ con $40.10 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_2B)_6$ con $30.70 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ y $(E_1B)_7$ con $1.48 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_2B)_7$ con $1.70 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.
- Finalmente, a pesar de que el tratamiento estadístico demostró la significancia del muestreo en la concentración del LAS, no se pudo establecer una clara relación entre la estacionalidad de dicho muestreo y la concentración, debido a que se encontraron tanto valores altos como bajos de LAS en las diferentes estaciones estudiadas (verano, primavera e invierno).

3.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN SEDIMENTOS MARINOS

3.1 - Contextualización

En el caso del jabón, a diferencia que en el LAS, existe sólo una cita bibliográfica que hace referencia al análisis de jabón en sedimentos marinos⁵. Por lo tanto, tanto por el número de muestras analizadas como la estacionalidad de las mismas, el trabajo estacional que se presenta a continuación es novedoso.

⁵ Gilleleje J.F., Cassani G., Ferrer J., López I.. *Linear Alkylbenzene sulphonates and soap analyzed in marine sediments from the Baltic Proper and Little Belt*. Tenside Surf. Det. 40; 1, 2003.

3.2 - Caracterización de las muestras

Las muestras analizadas fueron las mismas que para el caso del *LAS*, *Apartado 2.2*. Sin embargo, debido a la escasez de cantidad de muestra, se analizaron un número menor de muestras que para el *LAS*, seleccionando aquellos sedimentos con un mayor interés medioambiental.

En la *Tabla 7.7*, se caracterizan las muestras de sedimentos analizadas para el caso del jabón.

Tabla 7.7- Muestras de sedimentos marinos.

PRIMER MUESTREO: MAYO 2002
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .E) ₂
(E ₁ .O) ₂
SEGUNDO MUESTREO: JUNIO 2002
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .B) ₃
(E ₁ .S) ₃
TERCER MUESTREO: JULIO 2002
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .B) ₄
(E ₁ .S) ₄
CUARTO MUESTREO: ENERO 2003
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .B) ₅
(E ₁ .S) ₅
(E ₁ .O) ₅
QUINTO MUESTREO: ABRIL 2003
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .B) ₆
(E ₁ .S) ₆
(E ₁ .O) ₆
SEXTO MUESTREO: JULIO 2003
<i>Emisario 1</i>
(E ₁ .B) ₇
(E ₁ .S) ₇
(E ₁ .O) ₇

3.3 - Tratamiento de muestra

A continuación, se describe el procedimiento operatorio llevado a cabo para determinar la concentración de jabón presente en las muestras de sedimentos marinos:

- Secado hasta pesada constante y tamización (0.25 mm de luz de malla) de las muestras de sedimento marino.
- Conservación en recipiente de plástico debidamente etiquetado a 4 °C.
- Pesar, 5 g de muestra en los tubos del teflón del microondas.
- Añadir 50 mL de éter de petróleo y llevar a cabo la extracción en el microondas.
- Añadir 50 mL de agua, 50 mg de EDTA-3K y 25 mg de K_2CO_3 . Calentar durante 4 h a 105 °C.
- Añadir 50 mL de metanol. Extracción en el microondas.
- En un microreactor, pipetear 2 mL del extracto metanólico y 1 mL de disolución de patrón interno ($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).
- Evaporar hasta sequedad con corriente de N_2 .
- Añadir 100 μL de disolución de BrMMC (0.2% m/m en acetonitrilo) y 100 μL de disolución de éter corona (0.5% m/m en acetonitrilo).
- Calentar a 105 °C durante 5 minutos.
- Añadir 3.8 mL de agua. Volumen final de 4 mL.
- Inyección en el cromatógrafo de líquidos. Detección fluorescente.

3.4 - Resultados

En la **Tabla 7.8**, se muestran los resultados obtenidos. Cabe resaltar que la concentración de jabón presentada, al igual que la de LAS, es la concentración total, entendiendo como tal la suma de las concentraciones de cada uno de los homólogos analizados (C₁₂-C_{18:1}). Para calcular la concentración media total y la desviación estándar de la media, se analizaron dos réplicas experimentales y tres instrumentales por cada muestra para obtener un total de seis datos.

La diferencias con respecto al número de muestras analizadas para el LAS, se debe, de manera fundamental, a la escasez de la cantidad de muestra. Por la misma razón, tan sólo se analizó uno de los emisarios.

Tabla 7.8- Resultados de las muestras de sedimentos marinos.

PRIMER MUESTREO: MAYO 2002		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .E) ₂	95.01	2.34
(E ₁ .O) ₂	14.37	2.12
SEGUNDO MUESTREO: JUNIO 2002		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₃	726.18	3.18
(E ₁ .S) ₃	273.55	3.32

Tabla 7.8- Resultados de las muestras de sedimentos marinos (cont.)

TERCER MUESTREO: JULIO 2002		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₄	248,76	1.97
(E ₁ .S) ₄	75.38	2.67
CUARTO MUESTREO: ENERO 2003		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₅	140.08	2.17
(E ₁ .S) ₅	53.57	3.63
(E ₁ .O) ₅	47.32	1.53
QUINTO MUESTREO: ABRIL 2003		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₆	3580.54	0.97
(E ₁ .S) ₆	1225.02	1.45
(E ₁ .O) ₆	1324.12	1.67
SEXTO MUESTREO: JULIO 2003		
<i>Emisario 1</i>	Conc. (mg·Kg⁻¹)	D.E.R. (%)
(E ₁ .B) ₇	2940.61	2.67
(E ₁ .S) ₇	1018.08	2.89
(E ₁ .O) ₇	967.45	2.03

En la **Figura 7.3**, se muestra el cromatograma estándar para una muestra de sedimentos marinos. Al igual que para el caso de las muestras de lodos, cabe resaltar que se determinó un mayor porcentaje del jabón con cadena lineal más larga, debido a que el jabón “pesado” tiene una mayor tendencia a precipitar en presencia de sales, siendo su proporción aún mayor que la determinada para lodos de EDAR.

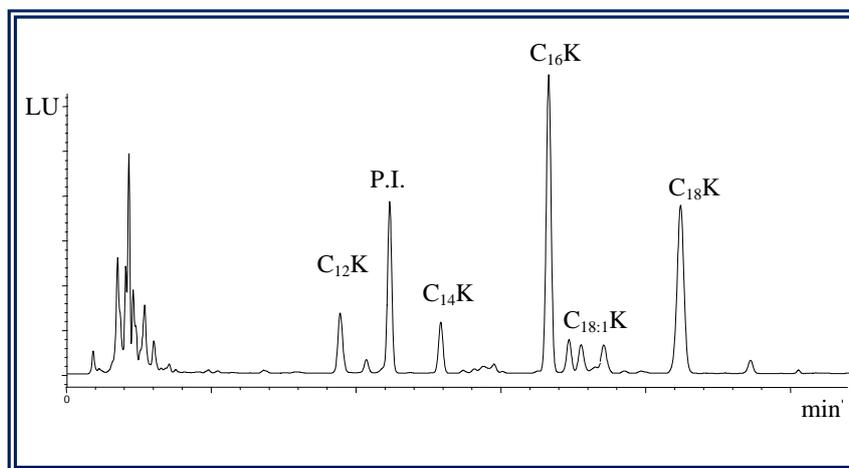


Figura 7.3- Cromatograma estándar para un sedimento marino.

En la **Tabla 7.9**, se muestran el porcentaje promedio de cada tipo de jabón para muestras de sedimentos marinos.

Tabla 7.9- Porcentaje promedio del jabón en muestras de sedimentos marinos.

JABÓN	PORCENTAJE (%)
C ₁₂	7.2
C ₁₄	6.8
C ₁₆	50.2
C _{18:1}	3.7
C ₁₈	32.1

3.5 - Tratamiento estadístico

El tratamiento seguido es similar al descrito en el *Capítulo 6, apartado 2.5*.

En cuanto a las variables estudiadas las diferencias con respecto al *LAS* fueron significativas:

- La concentración de jabón, la cual se dividió en cuatro variables conforme a los cuatro analitos determinados (C_{14} , C_{16} , C_{18} , $C_{18.1}$). Existiendo, por tanto, cuatro datos para cada muestra analizada.
- Punto de muestreo: se dividió tres niveles; 1 para muestras tomadas en la boca del emisario; 2 para muestras tomadas al Sur del emisario; 3 para muestras tomadas al Oeste.
- Toma: se dividió en seis, de acuerdo a las diferentes tomas realizadas en los mismos puntos durante diferentes meses.

En la *Tabla 7.10*, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el análisis por componentes principales.

Tabla 7.10- Análisis por componentes principales.

JABÓN	PC1	PC2
C ₁₄	0.537	0.225
C ₁₆	0.549	-0.102
C ₁₈	0.511	-0.804
C _{18:1}	0.491	0.540
PROPORCIÓN (%)	91.5	8.0

A diferencia de lo obtenido en el caso de los lodos de EDAR, con sólo una componente principal se podía explicar el 91.5 % del modelo establecido, con lo que, en este caso, no fue necesario establecer las consideraciones que se llevaron a cabo en el *Capítulo 6, apartado 3.5*.

Debido a la falta de datos, no se pudo aplicar con ciertas garantías ni el test de ANOVA ni el test de *Kruskal-Wallis*. Para estimar una posible relación entre las variables, se optó por usar la correlación de *Pearson*, con la cual se podía estimar un valor de p , y se podían establecer conclusiones acerca de las posibles relaciones entre las variables.

En la *Tabla 7.11*, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar la correlación de *Pearson*.

Tabla 7.11- Análisis estadístico.

VARIABLES	VALOR DE P	CONCLUSIÓN
PC1 vs punto de m.	0.435	No significativo
PC1 vs toma	0.017	Significativo

Teniendo en cuenta los valores de p obtenidos, sólo la toma es significativa en la concentración de jabón en sedimentos marinos, siendo el punto de muestreo no significativo.

3.6 - Discusión

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado anterior, se concluyó que:

- A pesar de que el tratamiento estadístico mostró que la toma en diferentes puntos no era significativa, los valores más altos de jabón para cada muestreo se encontraron en las muestras tomadas en la boca del emisario. Del mismo modo, los valores más bajos se determinaron en las muestras tomadas al Sur y al Oeste del emisario. Ejemplos son $(E_1.B)_3$ con $726.18 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_1.S)_3$ con $273.55 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, y $(E_1.B)_7$ con $2940.61 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_1.S)_7$ con $1018.08 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Esta aparente contradicción se puede explicar por la falta de datos al aplicar la correlación de *Pearson*, lo que no permite establecer unas conclusiones claras desde el punto de vista de la estadística.
- Aunque las mayores concentraciones de jabón se encontraron en muestreos correspondientes a las estaciones de primavera y verano ($(E_1.B)_7$ con $2940.61 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, $(E_1.B)_6$ con $3580.54 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), la falta de más datos en otras estaciones, impidió establecer una relación clara entre las estaciones y la concentración de jabón.

- En los muestreos en los que se analizaron tres muestras, no se pudo observar diferencias significativas en la concentración de jabón entre las tomas tomadas al Sur y al Oeste del emisario. Ejemplos son $(E_1.S)_6$ con $1225.02 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_1.O)_6$ con $1324.12 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, y $(E_1.S)_7$ con $1018.08 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $(E_1.O)_7$ con $967.45 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$.

4.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS ENTRE EL JABÓN Y EL LAS

Se compararon los resultados obtenidos por los analitos objetos de estudio, y se detectó que a pesar de ser tensioactivos de la misma familia (aniónicos), tanto las concentraciones como los patrones seguidos en su comportamiento eran sensiblemente diferentes para ambas sustancias.

A continuación se resumen las principales conclusiones que se obtuvieron de la comparación:

- Las concentraciones de jabón determinadas eran significativamente mayores que las encontradas para el LAS, siendo los máximos ($3580.54 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente $123.60 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) y los mínimos ($14.37 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ frente a $0.06 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) para cada analito diametralmente dispares. Este fenómeno pudo deberse, al igual que en el caso de lodos EDAR, al mayor consumo del jabón y a su mayor tendencia a precipitar.
- Para ambos casos, se observó diferentes concentraciones entre muestras tomadas en la boca del emisario y las recogidas al Este, al Oeste y al Sur, conteniendo estas últimas

cantidades de tensioactivos aniónicos sensiblemente menores que las obtenidas en la boca.

- Del igual modo, no se detectó, para ambos tensioactivos, variabilidad significativa entre las muestras recogidas al Sur, al Este y al Oeste para un muestreo dado.
- Para el caso del *LAS*, no se observó ninguna relación entre la concentración y la estacionalidad de los muestreos. En cambio, para el jabón, se detectaron mayores concentraciones para las estaciones más calurosas (primavera y verano). Sin embargo, la falta de datos impidió generalizar el comportamiento observado.

5.- DETERMINACIÓN DE JABÓN EN TIERRA

5.1 - Contextualización

De acuerdo con la bibliografía estudiada, no se había aplicado ninguna metodología analítica para la determinación de jabón en tierra. Teniendo en cuenta este hecho, en los siguientes apartados se describe la aplicación de la metodología propuesta para muestras de tierra de la Huerta de la Vega de Granada.

Los resultados obtenidos de esta aplicación fueron de utilidad para completar el estudio ambiental del jabón, el cual se inició con las aplicaciones llevadas a cabo en otras matrices (lodos de EDAR y sedimentos).

5.2 - Caracterización de las muestras

Las muestras analizadas fueron colectadas de 16 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, en Churriana de la Vega; en Granada, Las Gabias, Cullar y Alhendín. Una de las muestras procedentes de Belicena era de la Finca Santa María (FSM).

Las muestras fueron colectadas de la capa superficial (aproximadamente 0 – 10 cm) y en todas ellas no había ningún cultivo en el momento de la colecta.

En la *Tabla 7.12*, se muestran la localización de las muestras colectadas.

Tabla 7.12- Localización de las muestras de tierra analizadas.

MUESTRA	LOCALIZACIÓN	COORDENADAS (N)
T ₁	Granada	37°10'19.4''
T ₂	Granada	37°09'57.0''
T ₃	Churriana	37°09'10.8''
T ₄	Las Gabias	37°07'49.4''
T ₅	Las Gabias	37°07'16.6''
T ₆	Alhendín	37°06'54.0''
T ₇	Carretera de la Malahá	37°04'45.0''
T ₈	Polanco	37°05'14.3''
T ₉	Las Gabias	37°07'53.0''
T ₁₀	Cullar	37°09'46.9''
T ₁₁	Cullar	37°10'11.9''
T ₁₂	Belicena (FSM)	37°10'30.2''
T ₁₃	Belicena	37°10'49.4''
T ₁₄	Vegas del Genil	37°10'16.3''
T ₁₅	Churriana	37°10'34.6''
T ₁₆	Granada	37°10'35.0''

5.3 - Tratamiento de muestra

El tratamiento de muestra es el mismo que el descrito en el *Apartado 3.3* del presente capítulo.

5.4 - Resultados

En la *Tabla 7.13*, se muestran los resultados obtenidos. Cabe resaltar que la concentración de jabón presentada es la concentración total, entendiendo como tal la suma de las concentraciones de cada uno de los

homólogos analizados (C₁₂-C_{18:1}). Para calcular la concentración media total y la desviación estándar de la media, se analizaron dos réplicas experimentales y tres instrumentales por cada muestra para obtener un total de seis datos.

Tabla 7.13- Concentración calculada de las muestras de tierra analizadas.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg·Kg ⁻¹)	D.E.R. (%)
T ₁	18.83	0.53
T ₂	< L.D.	-
T ₃	30.38	0.65
T ₄	21.65	0.43
T ₅	25.42	0.49
T ₆	36.06	0.74
T ₇	35.91	0.71
T ₈	27.64	0.39
T ₉	16.22	0.69
T ₁₀	18.32	0.33
T ₁₁	< L.D.	-
T ₁₂	< L.D.	-
T ₁₃	< L.D.	-
T ₁₄	36.17	0.81
T ₁₅	9.72	0.62
T ₁₆	9.18	0.22

En la **Figura 7.4**, se muestra el cromatograma estándar para una muestra de tierra. Al igual que para el caso de las muestras de lodos y sedimentos, cabe resaltar que se encontró un mayor porcentaje del jabón con cadena lineal más larga.

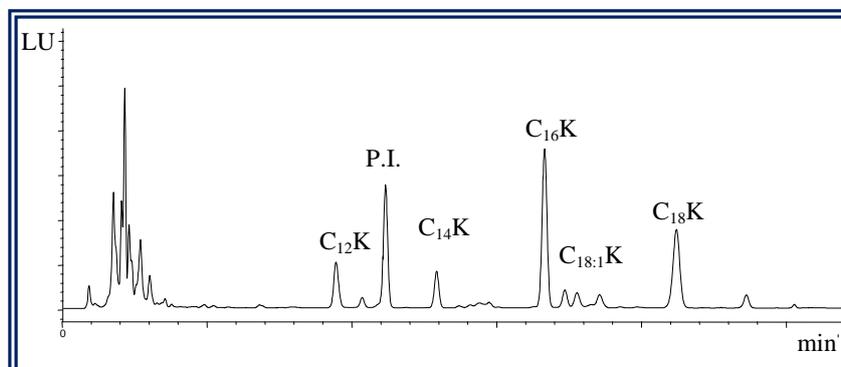


Figura 7.4- Cromatograma estándar para tierra.

En la **Tabla 7.14**, se muestran el porcentaje promedio de cada tipo de jabón para muestras de sedimentos marinos.

Tabla 7.14- Porcentaje promedio del jabón en muestras de tierra.

JABÓN	PORCENTAJE (%)
C ₁₂	4.2
C ₁₄	3.8
C ₁₆	49.3
C _{18:1}	6.7
C ₁₈	36.0

5.5 - Discusión

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado anterior, se concluyó que:

- Las concentraciones detectadas para jabón fueron sensiblemente menores que las calculadas para otras matrices ambientales, ya que como máximo se encontraron 36.17 mg·Kg⁻¹ frente a 3580.54 mg·Kg⁻¹ en sedimentos marinos y 190.36 g·Kg⁻¹ en lodos de EDAR.
- No se pudo establecer ninguna relación entre la concentración de jabón y la localización de la muestra, debido a que la cantidad de jabón dependía, en gran medida, de variables difícilmente medibles como la frecuencia de regado, tipo y duración de la última siembra, vertidos directos de detergente, uso de pesticidas, etc.

CAPÍTULO 8
ESTUDIO DE CAMPO

1 - INTRODUCCIÓN

En el presente Capítulo se aborda el estudio del jabón en un determinado ambiente natural, con objeto de conocer 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 jabón 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:

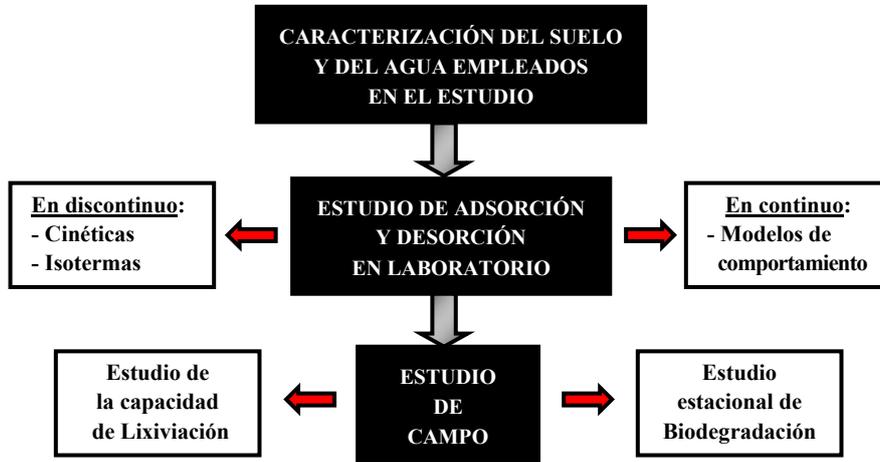


Figura 8.1- Esquema del estudio realizado.

2 - CARACTERIZACIÓN DEL SUELO Y DEL AGUA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

Como parte del estudio del comportamiento del jabón 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° 11'09,50'' N; 3° 41'39,85'' O (*Figura 8.2*). La muestra de suelo se tomó en el horizonte correspondiente a los primeros 25 cm de profundidad.

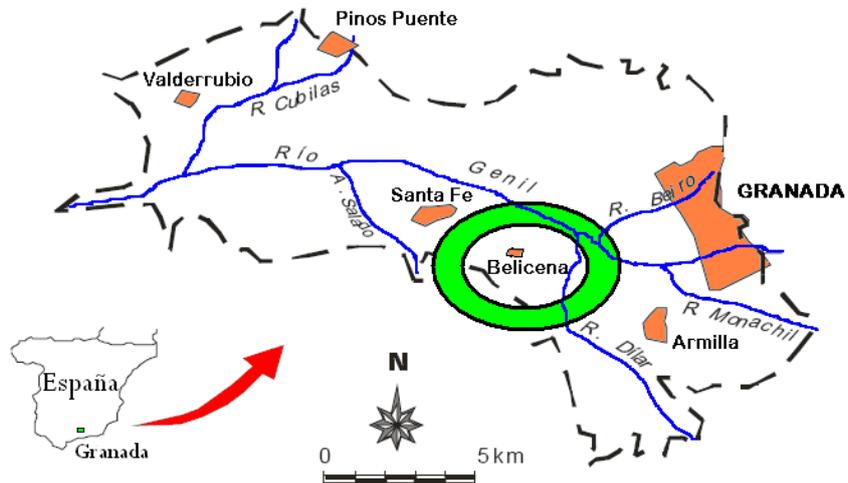


Figura 8.2- Zona de la Vega de Granada.

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*¹, requiere, como paso previo, lograr la individualidad de las partículas

¹ Robinson G.W. *A new method for mechanical analysis of soil and other dispersion*. J. Agr. Ac. 12; 306-321, 1922.

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_2O_2), 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_2O_2 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, 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 ($(NaPO_3)_6$) 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 $(NaPO_3)_6$.

- 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:

$$V_{\infty} = g (\rho_p - \rho_f) D_p^2 / 18\mu \quad (8.1)$$

donde V_{∞} es la velocidad estacionaria de caída ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), g es la aceleración de la gravedad ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-2}$), ρ_p es la densidad de la partícula ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), ρ_f es la densidad del fluido ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), D_p es el diámetro de la partícula (cm) y μ 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 μm), en segundo lugar, limos finos + arcillas (< 20 μm), y por último, arcillas (< 2 μm). Las alícuotas de la suspensión se recogen en una serie de crisoles tarados. Se secan los crisoles en estufa a 110 °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 μm), 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 °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 μm):

$$LG = \{[(F_1 - Ph) \cdot 50] / m\} - \{[(F_2 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (8.2)$$

- Porcentaje de los limos finos (*LF*) en el peso total de muestra (2 - 20 μm):

$$LF = \{[(F_2 - Ph) \cdot 50] / m\} - \{[(F_3 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (8.3)$$

- Porcentaje de las arcillas (*AR*) en el peso total de la muestra (< 2 μm):

$$AR = \{[(F_3 - Ph) \cdot 50] / m\} \cdot 100 \quad (8.4)$$

- Porcentaje de las arenas totales (A) en el peso total de la muestra ($> 50 \mu\text{m}$):

$$A = (F_4 / m) \cdot 100 \quad (8.5)$$

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*²) 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:

$$\rho = m / V \quad (8.6)$$

² Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas*. Ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, p.182, 1986

donde m es la masa de suelo seco (g) y V es el volumen de la muestra que ocupa el cilindro (cm^3), 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*²) 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 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:

$$\rho_r = (P_1 - P) \cdot \rho_t / [(P_1 - P) - (P_3 - P_2)] \quad (8.7)$$

donde ρ_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*²):

$$\theta = [(\rho_r - \rho) / \rho_r] \cdot 100 \quad (8.8)$$

donde θ es la porosidad (%), ρ_r es la densidad real ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y ρ 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*²). El porcentaje en peso de agua contenida en cien gramos de suelo seco, se halla mediante la expresión:

$$H = [(P_H - P_S) / P_S] \cdot 100 \quad (8.9)$$

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:

$$K = 2,3 \cdot [(a \cdot l) / (A \cdot t)] \cdot \log (h_0/h) \quad (8.10)$$

donde K es la permeabilidad ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), a es la sección del tubo manométrico de vidrio (cm^2), l es la altura del molde (cm), A es la sección del molde (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 .

G) Resultados

Las características físicas y mineralógicas resumidas en la **Tabla 8.1**, 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 8.1- 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*²) 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*³ (1951), que es un método volumétrico de oxidación-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 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:

³ Tyurin I.V. *Analytical procedure for a comparative study of soil humus*. Trudy Pochr. Inst. Dokuchaeva 33; 5-21, 1951

$$\text{M.O. (\%)} = \{[(V_b - V) \cdot F \cdot 0,3] / m\} \cdot F_1 \cdot F_2 \quad (8.11)$$

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*²). 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*⁴) 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 CO₂ y H₂O por ebullición con ácido sulfúrico concentrado, al tiempo que los citados compuestos nitrogenados se transforman en NH₄⁺, al formarse (NH₄)₂SO₄. Para acelerar esta reacción, se emplean catalizadores (Cu⁺², Hg⁺², 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 (NH₄)₂SO₄ producido en la digestión con NaOH, para formar Na₂SO₄ y NH₃ gaseoso; este último es separado por

⁴ 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

arrastré con aire y condensación. En la segunda fase se valora el NH_3 con H_2SO_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 K_2SO_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 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 H_2SO_4 a 0.005 N.

El porcentaje de nitrógeno en la muestra de suelo se calcula según la expresión:

$$N_T = (V \cdot N \cdot F \cdot 14) / (10 \cdot m) \quad (8.12)$$

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*²) 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: Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y 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 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 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 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.

G) Resultados

Cuanto a las características químicas, éstas pueden ser apreciadas en la **Tabla 8.2**, 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 Fe^{+3} y 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 interaccionar con especies cargadas, por medio de interacciones electrostáticas; la adquisición de cargas ocurre por ionización de los grupos 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 (CaCO_3) y al óxido de magnesio (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 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 (TiO_2), lo que le confiere al suelo una importante capacidad de interaccionar 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 8.2- Propiedades químicas suelo estudiado.

PROPIEDADES QUÍMICAS			
pH (KCl)	7.40	Cationes solubles del suelo (mg·Kg⁻¹ de suelo)	
pH (agua)	7.90	Ca ⁺²	44.50
Materia orgánica (%)	1.81	Mg ⁺²	37.00
Carbono orgánico (%)	1.05	Na ⁺	42.50
Carbonatos (% CO ₂)	15.4	Minerales	
Nitrógeno total (%)	0.07	Al ₂ O ₃ (%)	12.76
Capacidad de cambio (meq Na ⁺ /100g suelo)	22.12	SiO ₂ (%)	46.35
Bases de cambio (meq / 100 g de suelo)		Fe ₂ O ₃ (%)	4.97
Ca ⁺²	29.78	MnO (%)	0.08
Mg ⁺²	2.56	MgO (%)	4.01
Na ⁺	0.34	Na ₂ O (%)	1.76
K ⁺	0.49	K ₂ O (%)	2.15
Aniones solubles del suelo (mg·Kg⁻¹ de suelo)		TiO ₂ (%)	0.61
SO ₄ ⁻²	241.00	P ₂ O ₅ (%)	0.24
Cl ⁻	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 μm 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 mM Na_2CO_3 /1.0 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 H_2SO_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 8.3- Calibrado con los aniones.

Concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
Cl ⁻	[3.0; 20.0]
NO ₂ ⁻	[1.0; 5.0]
NO ₃ ⁻	[1.0; 10.0]
PO ₃ ⁻⁴	[1.0; 5.0]
SO ₄ ⁻²	[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 H_2SO_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 8.4- Calibrado con los cationes.

Concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
Na^+	[5.0; 20.0]
NH_4^+	[1.0; 5.0]
K^+	[2.0; 5.0]
Ca^{+2}	[5.0; 20.0]
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 8.3**, se muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras.

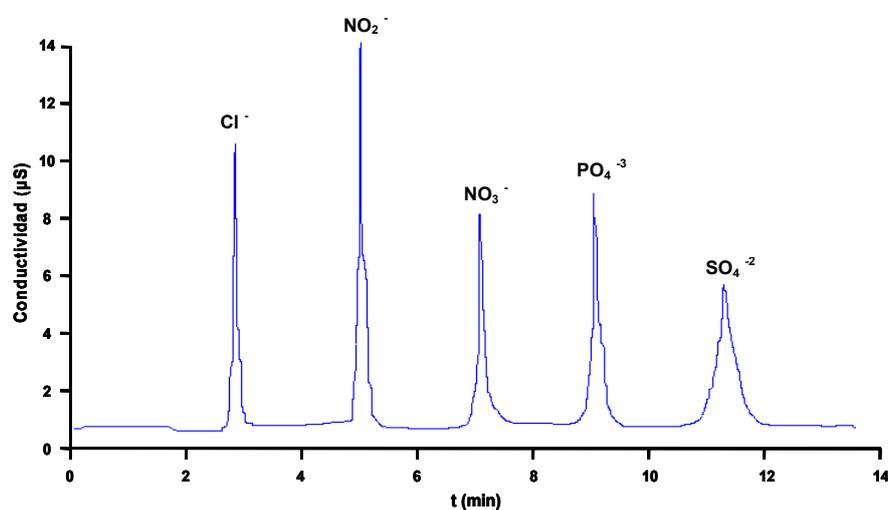


Figura 8.3- Cromatograma de determinación de los aniones.

A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8.5- Características del agua de pozo.

Características			
Cl ⁻ (mg·L ⁻¹)	23.60	Na ⁺ (mg·L ⁻¹)	26.25
NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	23.40	K ⁺ (mg·L ⁻¹)	6.00
NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	60.60	Ca ⁺² (mg·L ⁻¹)	45.00
PO ₄ ⁻³ (mg·L ⁻¹)	43.60	Mg ⁺² (mg·L ⁻¹)	4.42
SO ₄ ⁻² (mg·L ⁻¹)	95.00	Al ⁺³ (mg·L ⁻¹)	0.02
SiO ₂ (mg·L ⁻¹)	12.22	Fe ⁺³ (mg·L ⁻¹)	0.13
pH	7.53	Conductividad (μS)	1026

3 - ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN DEL JABON EN LABORATORIO

En este apartado se han estudiado las *cinéticas* e *isotermas* del proceso adsorción/desorción de cada uno de los homólogos de una mezcla de jabón. 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 retención 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 de los analitos estudiados, 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/desorción), isotermas y el pH.

Las experiencias se han realizado a 20 °C, con objeto de operar en las proximidades de la temperatura ambiente.

3.2.1 - 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}). 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 (0.25-5.0 gramos) con 20 mL de disolución del analito a una concentración de $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada homólogo, 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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

La concentración de analito retenido 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 jabón original de la disolución puesta en contacto con el suelo y la cantidad de jabón del líquido sobrenadante era la cantidad de sustancia adsorbida por el suelo y por el material utilizado en la experiencia.

En la siguiente gráfica (**Figura 8.4**), se muestran los resultados obtenidos. En ella se puede observar la cantidad de retenida de cada homólogo de jabón, expresada en $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de suelo, en función de la relación suelo/disolución aplicada en cada caso.

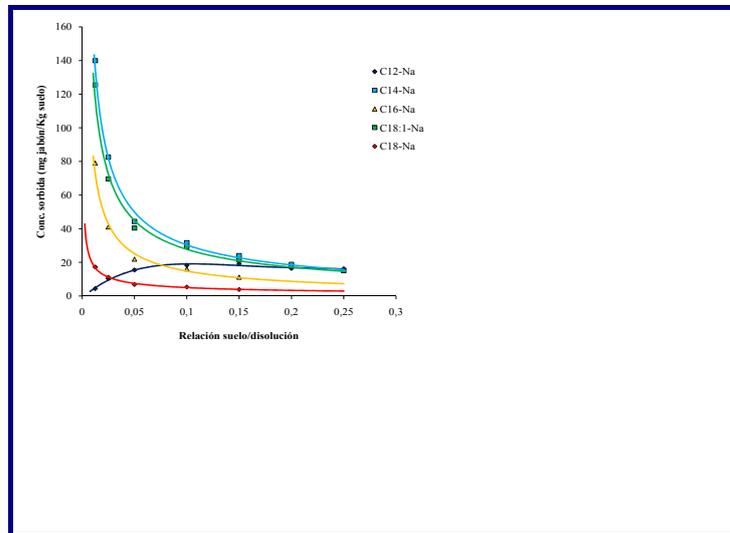


Figura 8.4- Concentración de los diferentes homólogos del jabón retenida en función de la relación suelo/disolución.

En todos los casos, excepto en el C₁₂-Na, la concentración de cada homólogo disminuye a medida que aumenta la proporción de suelo. El homólogo de cadena más corta C₁₂-Na, a pequeñas relaciones suelo/disolución sigue un comportamiento contrario al resto y a altas cantidades de suelo sigue el comportamiento esperado. El comportamiento anómalo del C₁₂-Na a bajas cantidades de suelo, fue atribuido a fenómenos de competencia debidos a la presencia de los demás homólogos. Por esta razón se repitió la experiencia anterior para el homólogo C₁₂-Na por separado. El resultado se muestra en la **Figura 8.5**.

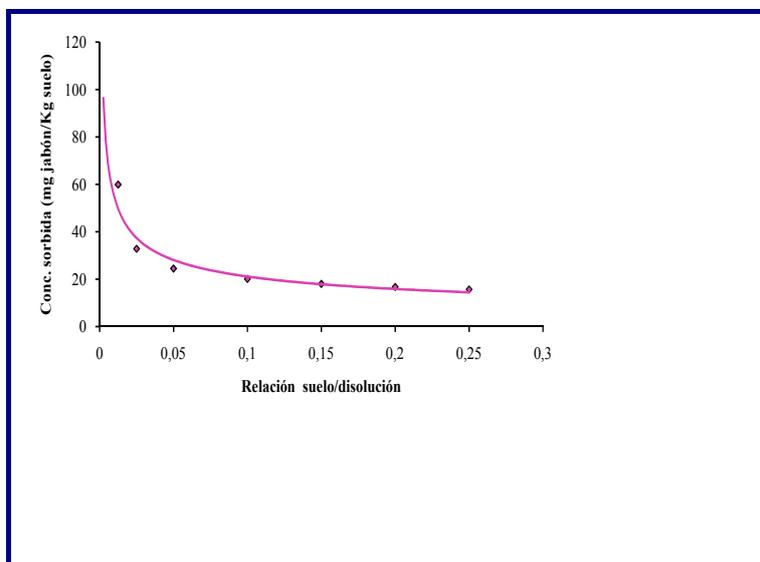


Figura 8.5- Concentración del homólogo C_{12} -Na retenido en función de la relación suelo/disolución.

Cuando se encuentra solo el C_{12} -Na, su comportamiento es el esperado. Este fenómeno indica que los homólogos de cadena más larga se retienen preferentemente.

Como situación de compromiso se seleccionó la relación 1/8 (0.125), (2.5 g de suelo y 20 mL de disolución de concentración de $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los homólogos), ya que permite una cuantificación adecuada y los fenómenos de intercambio iónico resultan minimizados.

3.2.2 - Aplicación de modelos simples al estudio de adsorción/desorción. Cinética de adsorción y desorción. 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 introdujeron 2.5 g de suelo y se añadieron 20 mL de disolución acuosa de jabón de concentración $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada homólogo. Los frascos se situaron en un agitador giratorio orbital y fueron sometidos a diferentes tiempos de agitación (2.5, 7.5, 10.0, 12.5, 20.0, 30.0, 45.0, 60.0, 120.0, 180.0 min) a 150 rpm, y a una temperatura de 20 °C. Una vez transcurrido el tiempo de agitación para cada frasco, se separó la fase sólida de la líquida, por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. De la fracción líquida de cada frasco, se transfirió 10 mL a un vial de cromatografía y se la añadió 0.5 mL de disolución de patrón interno para su análisis por HPLC con detección con DAD, siguiendo el protocolo descrito de derivación en el **Capítulo 3** de la presente Memoria, el cual era extrapolable al análisis de jabón sódico. Para cada punto experimental se realizó una réplica. En la **Tabla 8.6**, se muestran las condiciones empleadas para este estudio.

Tabla 8.6– Condiciones para el estudio de la cinética de adsorción.

Soluto	Relación suelo/disolución	Conc. Inicial de jabón total	T. agitación (min)	Temp.
C ₁₂ Na-C ₁₈ Na	(1/8)	100 mg·L ⁻¹	2, 5, 8, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300	20 °C

Con los datos obtenidos se obtuvieron las curvas que muestran la evolución de la cantidad retenida de cada homólogo por unidad de masa de suelo frente al tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8.6**. Su estudio permitió determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre el suelo y la disolución empleada.

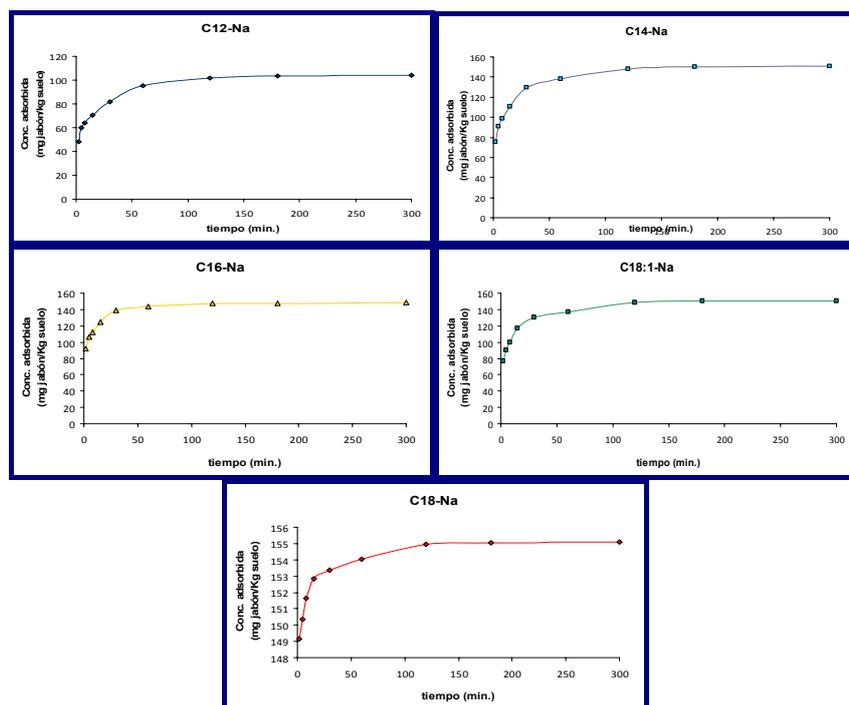


Figura 8.6- Cinética de adsorción para los homólogos del jabón.

En la siguiente **Figura 8.7**, se muestra la cinética de adsorción conjunta de los homólogos a una concentración inicial de $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por cada uno de ellos. En ella puede observarse que el equilibrio se alcanza a partir de 120 minutos.

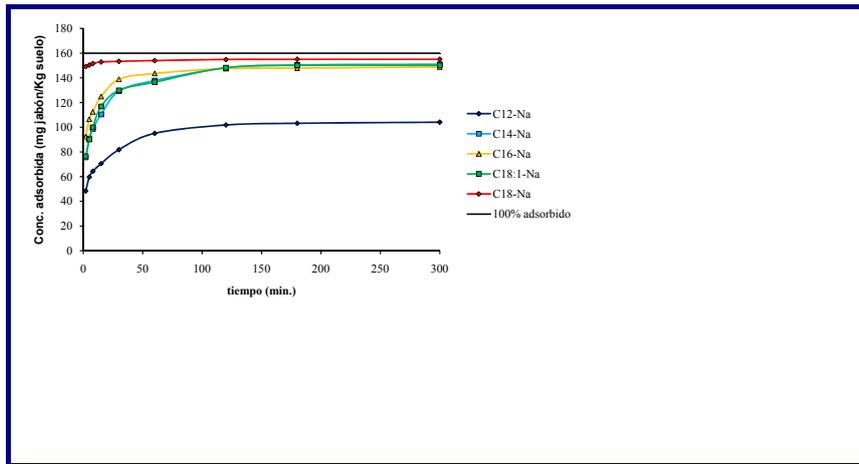


Figura 8.7- Representación conjunta de las cinéticas de adsorción para los homólogos del jabón.

El modelo matemático que puede usarse para un adecuado ajuste a este tipo de funciones hiperbólicas es el siguiente:

$$X = \frac{X_{\max} \cdot t}{B + t} \quad (8.13)$$

ó en su forma lineal:

$$\frac{1}{X} = \frac{B}{X_{\max} \cdot t} + \frac{1}{X_{\max}} \quad (8.14)$$

En esta expresión, X representa la cantidad de jabón retenida ($\text{mg}\cdot\text{kg}$ suelo $^{-1}$) a un tiempo determinado t (min), B es una constante y X_{\max} es la

cantidad máxima de sustancia adsorbida por el sólido en estudio cuando transcurre un tiempo infinito; esta cantidad puede estimarse determinando la ordenada en el origen de la forma lineal de esta ecuación. Los resultados obtenidos para este parámetro se muestran en la **Tabla 8.7**.

Tabla 8.7 - Cantidad máxima de cada homólogo adsorbido por el suelo.

	X_{\max} (mgjabón·Kg suelo ⁻¹)	% Adsorbido
C ₁₂ -Na	105.89	66.18
C ₁₄ -Na	152.42	95.26
C ₁₆ -Na	150.66	94.16
C _{18:1} -Na	152.34	95.21
C ₁₈ -Na	155.11	96.94

El análisis de los resultados obtenidos indica que la retención del tensioactivo es inicialmente rápida, produciéndose en los primeros minutos de contacto entre suelo y disolución. La cantidad de jabón degradada durante este tiempo es despreciable como indicó el experimento de jabón en agua desionizada, sin la adición de suelo. Para los siguientes experimentos, se fijó un tiempo de equilibrio de 120 min.

➤ **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 preparó una serie de frascos con contenido idéntico a la experiencia anterior, en la que previamente se llevó a cabo el proceso de adsorción durante 120 minutos. A continuación, se centrifugaron para

retirar la fase líquida y se añadió 20 mL de agua milli-Q a cada uno de ellos. Los frascos así preparados, se agitaron mecánicamente, con un agitador giratorio orbital a 12 rpm, y a temperatura de 20 °C durante distintos tiempos (2, 5, 8, 15, 30, 60, 120, 180 y 300 min) con la finalidad de desorber el analito del suelo. Por último, se separó la fase sólida de la líquida, mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min, donde fue recogida parte de la fracción líquida (10 mL), que posteriormente fue diluida con 0.5 mL de patrón interno para su análisis por HPLC con detección con DAD, siguiendo el protocolo descrito de derivación en el **Capítulo 3** de la presente Memoria. Para cada punto experimental se realizó una réplica. En la **Figura 8.8**, se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

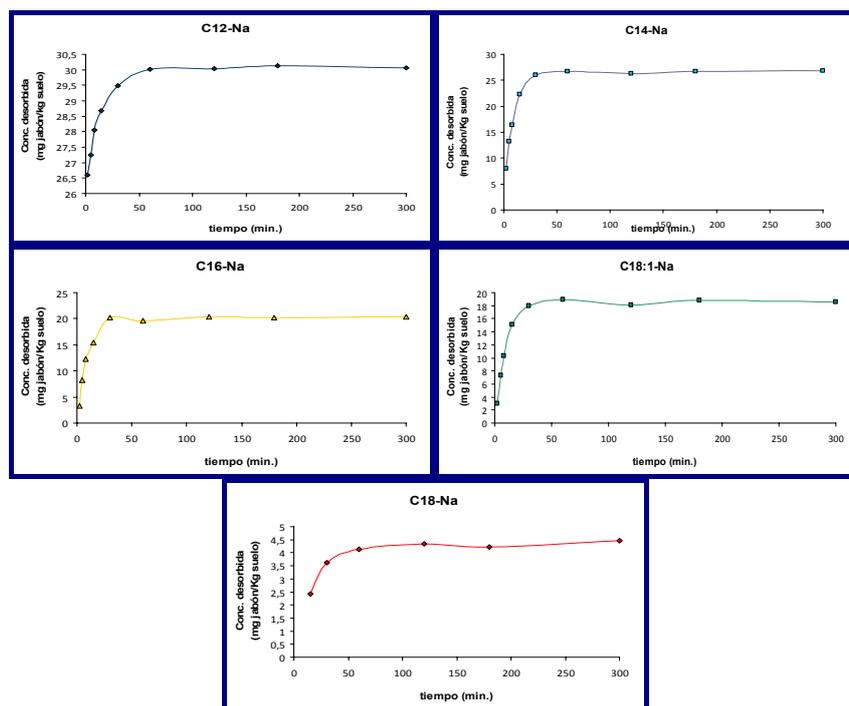


Figura 8.8- Cinética de desorción para los homólogos del jabón.

En la **Figura 8.9**, se muestran las cinéticas de desorción conjunta de los homólogos utilizando una concentración inicial de $20.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En ella se puede observar que el equilibrio de desorción se alcanza a partir de 200 minutos para todos los homólogos.

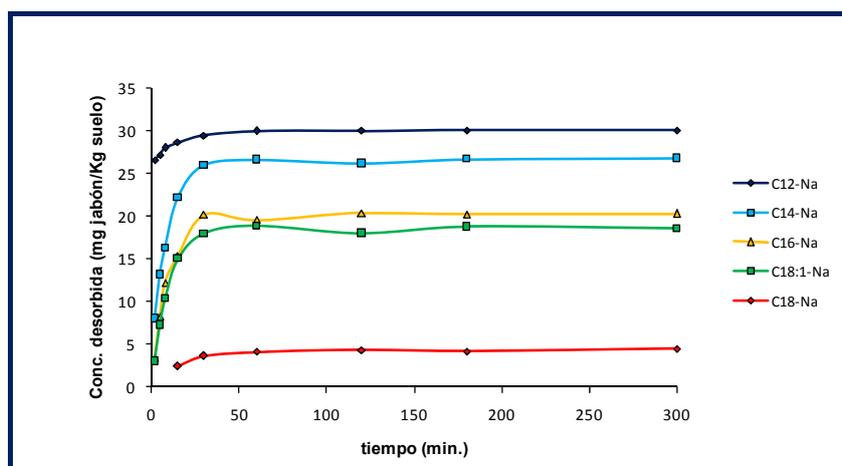


Figura 8.9- Representación conjunta de las cinéticas de desorción para los homólogos del jabón.

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 8.8 - Cantidad máxima de cada homólogo desorbida por el suelo.

	X_{\max} (mgJabón·Kg suelo ⁻¹)	% Desorbido
C ₁₂ -Na	30.16	28.48
C ₁₄ -Na	28.11	18.44
C ₁₆ -Na	21.73	14.42
C _{18:1} -Na	20.03	13.15
C ₁₈ -Na	4.68	3.01

De la observación de los datos obtenidos, se llegó a la conclusión de que la capacidad de adsorción del jabón es elevada, incrementándose con la longitud de la cadena del homólogo. Sin embargo, en el fenómeno de la desorción se observó lo contrario, a medida que aumentaba la cadena hidrocarbonada disminuía el porcentaje desorbido.

La baja desorción del jabón junto con la baja solubilidad, **Tabla 8.9**, de sus sales cálcicas, nos hizo considerar la posibilidad de la participación de la precipitación en el proceso global, debido a la presencia de sales cálcicas en el suelo.

Tabla 8.9– Solubilidad de las sales cálcicas de los homólogos del jabón.

Sales cálcicas del jabón	Solubilidad (mg·L ⁻¹) 20°C
C12-Ca	8.7
C14-Ca	0.57
C16-Ca	0.037
C18-Ca	0.0023
C18:1-Ca	40 (25°C)

3.2.3 - Control del pH

Todo proceso de adsorción/desorción está fuertemente condicionado por el pH, ya que tanto la carga de la materia orgánica como la de las arcillas del suelo dependen de él. Por otra parte, a valores del pH inferior a 7, el jabón es insoluble en agua debido a la formación del ácido graso libre. Por estas razones, en las experiencias realizadas, se midió el pH al inicio de la experiencia (t_0) y una vez alcanzado el equilibrio (t_{120} para la adsorción y t_{200} para la desorción) de las diferentes mezclas suelo/disolución estudiadas. En **Tabla 8.10**, se recogen los valores obtenidos. Puede observarse que no existió una variación significativa durante el transcurso de las experiencias realizadas.

Tabla 8.10- Valores de pH de los sistemas estudiados.

	pH
Agua milli-Q	7.09
Jabón 20 mg·Kg ⁻¹ +suelo (t_0)	7.96
Jabón 20 mg·Kg ⁻¹ +suelo (t_{120})	8.05
Agua milli-Q+suelo (t_0)	8.12
Agua milli-Q+suelo (t_{120})	8.13

3.2.4 - Establecimiento de las Isotermas

➤ Isoterma de adsorción

De los modelos posibles, se han seleccionado el propuesto por *Freundlich* y el propuesto por *Langmuir* que responden a la adsorción de un soluto en disolución sobre un adsorbente sólido.

Estos modelos se rigen mediante las ecuaciones:

Modelo de Freundlich

$$X = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (8.15)$$

o en su forma lineal:
$$\text{Log } X = \text{Log } K_f + \frac{1}{n} \text{Log } C_e \quad (8.16)$$

Modelo de Langmuir

$$X = \frac{K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (8.17)$$

o en su forma lineal:
$$\frac{1}{X} = 1 + \frac{1}{K_L \cdot C_e} \quad (8.18)$$

donde X representa la cantidad de cada homólogo del jabón adsorbida por el suelo en estudio una vez alcanzado el equilibrio, C_e es la concentración de equilibrio de cada homólogo del jabón en la disolución, K_f , K_L y n son tres constantes que dependen de la naturaleza de la sustancia en estudio, suelo y temperatura.

Una vez fijados la relación suelo/disolución y el tiempo de agitación necesario para alcanzar el equilibrio, se procedió a aplicar los modelos seleccionados para los diferentes homólogos del jabón. Con esta finalidad, a una temperatura de 20 °C, se sometieron a agitación, una serie de mezclas suelo/disolución (2.5 g de suelo y 20 mL de disolución) con concentraciones crecientes de jabón de coco comercial (5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 45 mg·L⁻¹) en frascos de polipropileno de 70 mL de capacidad a

12 rpm. Una vez transcurrido el tiempo fijado para alcanzar el equilibrio (2 horas), se separaron ambas fases por centrifugación (4000 rpm durante 10 minutos). Parte de la fracción líquida (10 mL) fue recogida y diluida con 0.5 mL de patrón interno para su análisis por HPLC con detección con DAD, siguiendo el protocolo descrito de derivación en el **Capítulo 3** de la presente Memoria. Para cada punto experimental se obtuvo dos réplicas. A continuación, en la **Tabla 8.11**, se resumen las condiciones empleadas en este estudio:

Tabla 8.11– Condiciones para el estudio de la isoterma de adsorción.

Soluto	Relación suelo/disolución	Conc. Inicial (mg·L ⁻¹)	T. agitación (min)	Temp.
C ₁₂ Na-C ₁₈ Na	(1/8)	Entre 5 y 45	120	20 °C

A partir de los resultados obtenidos, se efectuó el tratamiento de los datos, y el balance de materia para cada uno de los homólogos del jabón, a través de la determinación de X (cantidad del soluto retenido en el suelo, expresado en mg·kg⁻¹) y de C_e (concentración en equilibrio en la disolución, expresada en mg·L⁻¹) y teniendo en cuenta la concentración inicial (C_0 , expresada en mg·L⁻¹). Los resultados analíticos obtenidos muestran que todos los homólogos, exceptuando el C₁₂-Na, quedan totalmente retenidos en el suelo al cabo de 120 minutos, siendo las concentraciones encontradas en disolución inferiores al límite de detección del método analítico. En las **Tablas 8.12 y 8.13**, se recogen los datos para el caso del homólogo C₁₂-Na. Se han aplicado los modelos clásicos correspondientes a las isotermas de *Freundlich* y *Langmuir*.

Tabla 8.12- Valores de las concentraciones iniciales y de equilibrio utilizados para la obtención de la isoterma de Freundlich.

Isoterma de adsorción C ₁₂ -Na				
Modelo Freundlich				
C ₀ (mg·L ⁻¹)	C _e (mg·L ⁻¹)	X (mg·Kg ⁻¹)	Log C _e	Log X
2.396	1.366	8.240	0.135	0.916
2.396	1.600	6.368	0.204	0.804
3.355	2.101	10.032	0.322	1.001
3.355	2.403	7.616	0.381	0.882
4.793	3.658	9.080	0.563	0.958
4.793	3.201	12.736	0.505	1.105
7.190	5.225	15.720	0.718	1.196
7.190	5.310	15.040	0.725	1.177
9.586	7.348	17.904	0.866	1.253
9.586	6.984	20.816	0.844	1.318
11.982	8.301	29.448	0.919	1.469
11.982	8.154	30.624	0.911	1.486
14.379	9.761	36.944	0.989	1.568
14.379	9.405	39.792	0.973	1.600
21.568	11.470	80.784	1.060	1.907
21.568	11.306	82.096	1.053	1.914

La representación de X frente a C_e se muestra en la **Figura 8.10**.

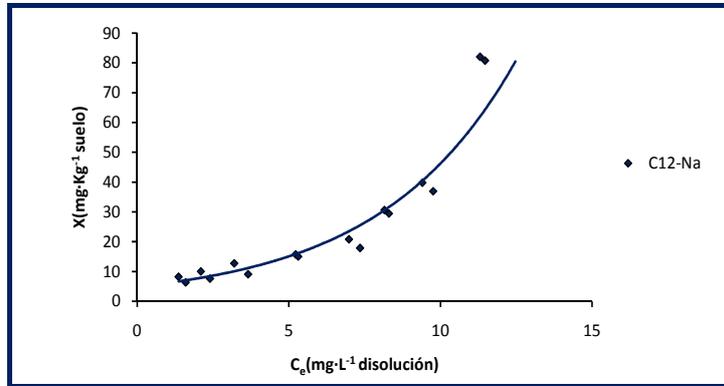


Figura 8.10- Isoterma de adsorción.

En la **Figura 8.11**, se muestra la representación correspondiente al modelo de *Freundlich* en su forma lineal.

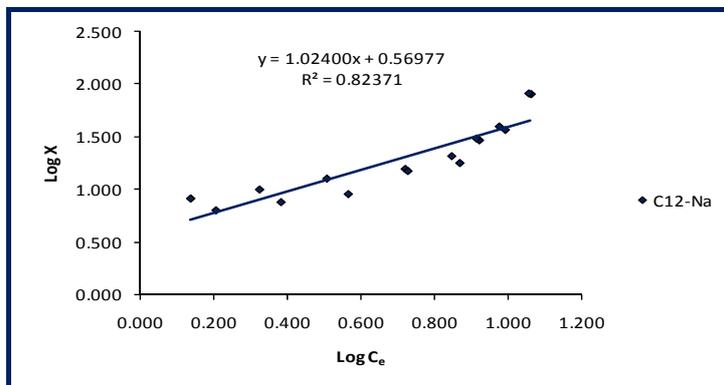


Figura 8.11- Ajuste de la isoterma de adsorción al modelo Freundlich.

Asimismo, se aplicó el modelo de *Langmuir*, **Tabla 8.13** y **Figura 8.12**:

Tabla 8.13- Valores de las concentraciones iniciales y de equilibrio utilizados para la obtención de la isoterma de Langmuir.

Isoterma de adsorción C₁₂-Na		
Modelo Langmuir		
C₀ (mg·L⁻¹)	1/X (Kg·mg⁻¹)	1/Ce (L·mg⁻¹)
2.396	0.121	0.732
2.396	0.157	0.625
3.355	0.100	0.476
3.355	0.131	0.416
4.793	0.110	0.273
4.793	0.079	0.312
7.190	0.064	0.191
7.190	0.066	0.188
9.586	0.056	0.136
9.586	0.048	0.143
11.982	0.034	0.120
11.982	0.033	0.123
14.379	0.027	0.102
14.379	0.025	0.106
21.568	0.012	0.087
21.568	0.012	0.088

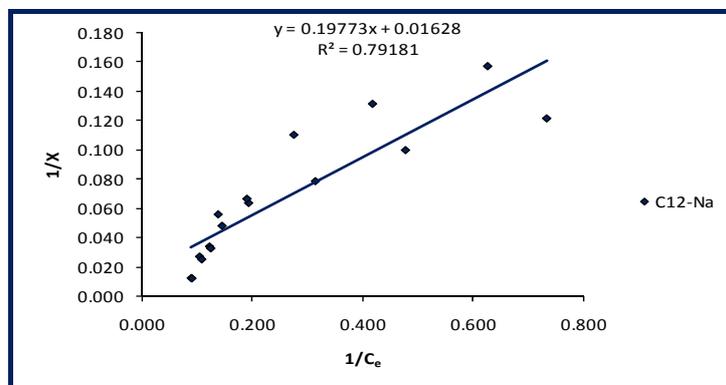


Figura 8.12- Ajuste de la isoterma de adsorción al modelo Langmuir.

De la observación de las anteriores gráficas, se pone de manifiesto que la isoterma obtenida no se ajusta a ninguno de los modelos referidos, lo cual puede ser indicativo de que se trate de un fenómeno de mayor complejidad donde coexistan procesos de adsorción en la superficie y en el interior de los poros, así como una etapa de precipitación teniendo en cuenta la escasa solubilidad de las sales alcalinotérreas.

A) Isoterma de desorción

Para el cálculo de la isoterma de desorción, se partió de un suelo que ya había alcanzado previamente el equilibrio en el proceso de adsorción a diferentes concentraciones de jabón de coco comercial (5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 y 45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A dichos suelos, se les añadía 20 mL de agua Milli-Q y se agitaban mecánicamente en los frascos, a 12 rpm, a una temperatura de 20 °C durante un tiempo de 200 min previamente establecido. A continuación, se separaba la fase sólida de la líquida, por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, donde parte de la fracción líquida (10 mL) fue recogida y diluida con 0.5 mL de patrón interno para

su análisis por HPLC con detección con DAD, siguiendo el protocolo descrito de derivación en el **Capítulo 3** de la presente Memoria. Para cada punto experimental, fue realizada dos réplicas. Los resultados analíticos obtenidos muestran, al igual que en el proceso de adsorción, que todos los homólogos, exceptuando el C₁₂-Na, quedan totalmente retenidos en el suelo, siendo las concentraciones encontradas en disolución inferiores al límite de detección del método analítico. En las **Tablas 8.14** y en la **Figura 8.13**, se recogen los datos para el caso del homólogo C₁₂-Na. Se han aplicado los modelos clásicos correspondientes a las isothermas de *Freundlich* y *Langmuir*.

Tabla 8.14- Valores de las concentraciones iniciales y de equilibrio utilizados para la obtención de la isoterma de Langmuir.

Isoterma de desorción C ₁₂ -Na		
C ₀ (mg·L ⁻¹)	C _e (mg·L ⁻¹)	X (mg·Kg ⁻¹)
2.396	0.101	5.520
2.396	0.105	5.212
3.355	0.121	9.064
3.355	0.114	6.704
4.793	0.345	6.320
4.793	0.131	7.023
7.190	0.665	7.525
7.190	0.602	8.121
9.586	1.122	8.928
9.586	1.014	12.704
11.982	1.491	17.520
11.982	1.611	17.736
14.379	2.161	19.656
14.379	2.090	23.072
21.568	3.694	51.232
21.568	3.807	51.640

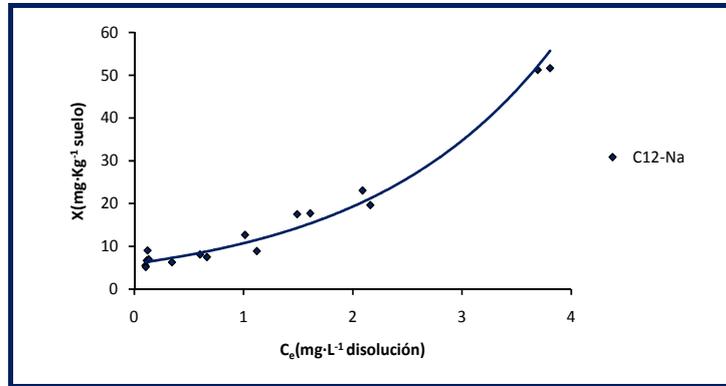


Figura 8.13- Isoterma de desorción.

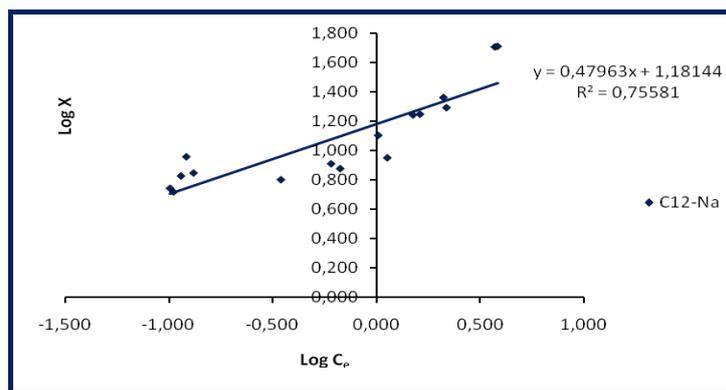


Figura 8.14- Ajuste de la isoterma de desorción al modelo Freundlich.

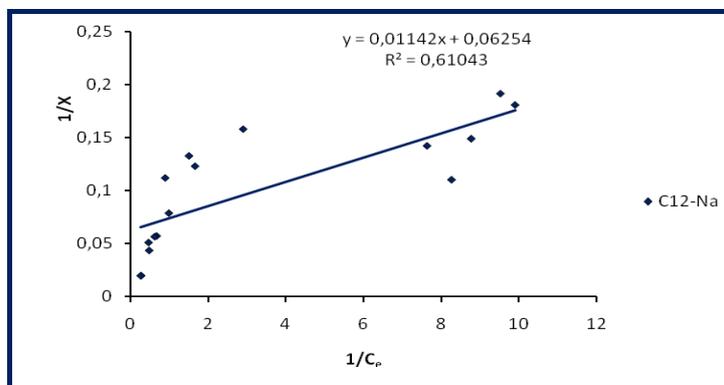


Figura 8.15- Ajuste de la isoterma de desorción al modelo Langmuir.

De la misma manera que en el caso de la adsorción, ninguno de los modelos propuestos se ajusta a los resultados obtenidos, lo cual, al igual que en el apartado anterior, puede ser indicativo de que se trate de un fenómeno de mayor complejidad donde coexistan procesos de adsorción en la superficie y en el interior de los poros, así como una etapa de precipitación teniendo en cuenta la escasa solubilidad de las sales alcalinotérricas.

3.2.5 - Aplicación de un modelo complejo al estudio de adsorción/desorción

B) Justificación y resolución matemática del modelo propuesto

Para abordar este estudio, se procedió a un análisis de los datos obtenidos similar al realizado por *J.D. Lopez-González y col*⁵ para el caso del LAS,

⁵ López González J.D., Valenzuela Calahorra C., Jiménez López A., Ramírez Sáenz A. Retención de lauril-aril-sulfonato sódico (L.A.S.) por un carbón activo. An.Quim. 75; 186, 1979.

pues de forma similar, el jabón se puede retener en la superficie de un sólido fijándose a centros positivos (cationes) por interacciones electrostáticas, y por adsorción física debida a enlaces por fuerzas de Van der Waals. Asimismo, la adsorción puede tener lugar tanto en la forma aniónica como en la molecular, en función del pH del medio.

El sistema sólido empleado (suelo) es notablemente complejo en su composición y constitución. Cada uno de los componentes tiene un comportamiento específico como adsorbente. No obstante, bajo un punto de vista formal, el suelo utilizado como adsorbente se podría considerar como un “adsorbente único”.

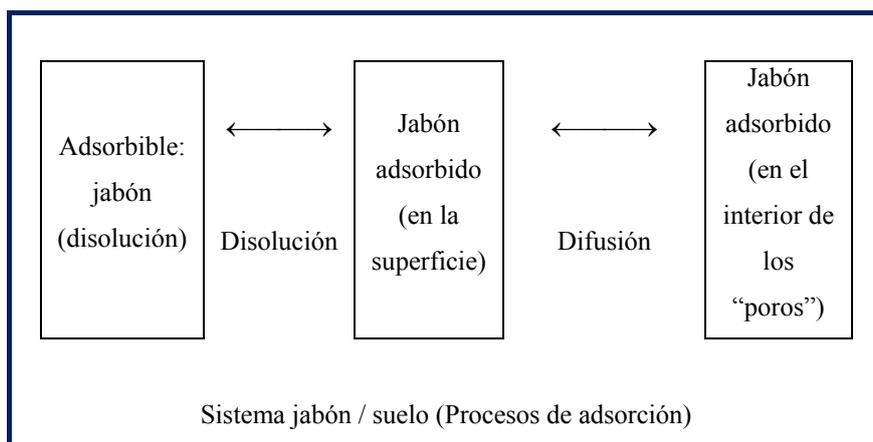


Figura 8.16- Procesos de adsorción.

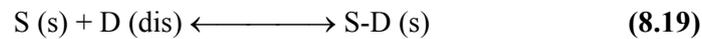
En el sistema en estudio de acuerdo con las consideraciones efectuadas, se distinguen:

1.- Dos procesos reversibles de adsorción-desorción:

- En la superficie más externa del adsorbente.
- En el interior de los poros del mismo.

2.- *Un proceso de precipitación del jabón en la superficie del adsorbente a concentraciones elevadas.*

Cada uno de los procesos reversibles de adsorción/desorción se puede representar mediante la ecuación:

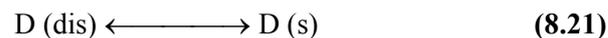


Para los que se pueden aplicar las correspondientes leyes cinéticas y de equilibrio. En principio, la ley cinética viene dada por la expresión:

$$-\frac{dC}{dt} = k_a \cdot C_e \cdot (1 - \theta) - k_{des} \cdot \theta \quad (8.20)$$

donde k_a representa la velocidad específica de adsorción, k_d es la velocidad específica de desorción, C_e concentración de cada homólogo de jabón en la disolución en equilibrio con la fase sólida, y θ es la fracción de cubrimiento de los centros activos del sólido adsorbente.

De manera semejante, para el proceso de precipitación anteriormente aludido:



se puede escribir la siguiente ley cinética:

$$-\frac{dC}{dt} = k_p \cdot C_e^m - k_{dis} \cdot \theta \quad (8.22)$$

donde k_p representa la constante de precipitación, k_{dis} es la constante de disolución y m el orden aparente respecto a la concentración.

En la práctica, aunque se trata de procesos reversibles, a concentraciones muy bajas y a tiempos pequeños, la cantidad desorbida no es significativa, por lo que los datos experimentales correspondientes a cada uno de los dos procesos sencillos antes aludidos (adsorción superficial y adsorción en los poros), se suelen ajustar satisfactoriamente a la ley cinética correspondiente a un proceso irreversible:

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{d\theta}{dt} = k_a \cdot C_e \cdot (1 - \theta) \quad (8.23)$$

cuya integración conduce a:

$$\theta = \frac{n^s}{n_m^s} = \frac{C_0}{C_0 - C_e} \cdot [1 - \exp(-k_a \cdot t)] \quad (8.24)$$

$$n^s = \frac{n_m^s \cdot C_0}{C_0 - C_e} \cdot [1 - \exp(-k_a \cdot t)] \quad (8.25)$$

$$n_m^s = \frac{C_0 - C_e}{1000} \cdot \frac{V}{m} \quad (8.26)$$

Donde n^s son los moles adsorbidos por unidad de masa de adsorbente,

n_m^s es la capacidad de adsorción (moles máximos adsorbidos por unidad de masa de adsorbente), V volumen de disolución (mL), m masa del adsorbente, y C_0 concentración inicial de jabón para cada homólogo.

Sustituyendo (8.25) en (8.26) resulta:

$$n^s = \frac{V \cdot C_0}{1000 \cdot m} \cdot [1 - \exp(-k_a \cdot t)] = A \cdot [1 - \exp(-k_a \cdot t)] \quad (8.26)$$

En el caso en que concurren los dos procesos sencillos de adsorción/desorción postulados:

$$n^s = \sum_{i=1}^{i=2} A_{(i)} \cdot [1 - \exp(-k_{a(i)} \cdot t)] \quad (8.27)$$

En la práctica, cuando se opera en las condiciones habituales (concentraciones muy bajas y tiempos pequeños), no se suele apreciar contribución alguna del proceso de precipitación.

Las isotermas de desorción se han ajustado a la ecuación:

$$n^s = \sum_{i=1}^{i=2} A_{(i)} \cdot [1 - \exp(-k_{d(i)} \cdot t)] \quad (8.28)$$

En el equilibrio, los resultados experimentales obtenidos en un experimento de adsorción/desorción se suelen representar en la forma $n^s = f(C_e/C_0)$ o $n^s = f(C_e)$, definiendo así la correspondiente isoterma del proceso “global”, la cual es, a su vez, el resultado de la suma de las isotermas individuales de los procesos sencillos que intervienen.

Para cada uno de los “procesos sencillos” de adsorción/desorción aludidos, a partir de la ecuación (8.20) se llega, a las ecuaciones de las isothermas de equilibrio siguientes:

$$\theta = \frac{n^s}{n_m^s} = \frac{K_a \cdot C_e}{1 + K_a \cdot C_e} \quad (8.29)$$

$$n^s = \frac{n_m^s \cdot K_a \cdot C_e}{1 + K_a \cdot C_e} \quad (8.30)$$

Donde K_a es la constante de equilibrio de adsorción. Siendo la ecuación 8.30 coincidente con la original de *Langmuir*.

Para el “proceso sencillo” de precipitación/disolución, a la vista de la ecuación (8.22) se llega a:

$$\theta = K_p \cdot C_e^m \quad (8.31)$$

$$n^s = B \cdot C_e^m \quad (8.32)$$

Donde K_p representa a la constante de equilibrio de precipitación.

En el caso de que en el equilibrio intervengan los dos procesos reversibles de adsorción/desorción anteriormente mencionados, la isoterma global debe responder a la ecuación:

$$n^s = \sum_{i=1}^{i=2} \frac{n_{m(i)}^s \cdot K_{a(i)} \cdot C_e}{1 + K_{a(i)} \cdot C_e} \quad (8.33)$$

Y si, además, interviene el mencionado “proceso sencillo de precipitación” resulta:

$$n^s = \sum_{i=1}^{i=2} \frac{n_{m(i)}^s \cdot K_{a(i)} \cdot C_e}{1 + K_{a(i)} \cdot C_e} + B \cdot C_e^m \quad (8.34)$$

Ecuación que, en principio, se puede aceptar como “ecuación general” para el ajuste de las isothermas de equilibrio de adsorción/desorción de un adsorbible en disolución por un sólido adsorbente. En cada caso, la ecuación se puede simplificar dependiendo de los “procesos sencillos” que intervengan.

C) Aplicación del modelo al estudio de las cinéticas de adsorción

La aplicación del modelo propuesto a las isothermas de cinética de adsorción se muestra en las siguientes, *Figuras 8.17 a 8.21*, en donde se ha realizado el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (8.27).

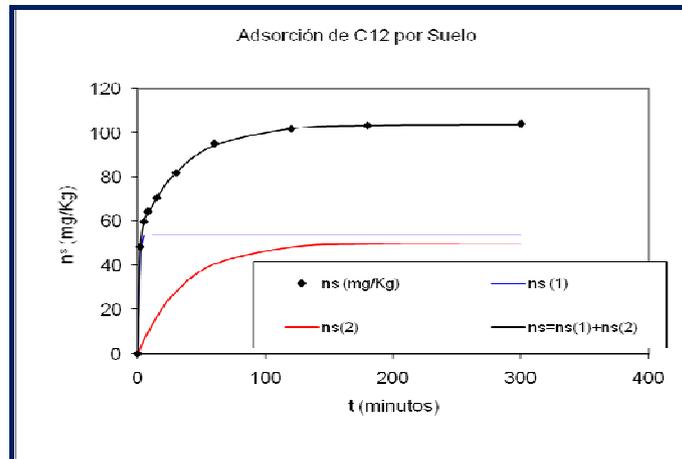


Figura 8.17- Cinéticas de los procesos de absorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₂.

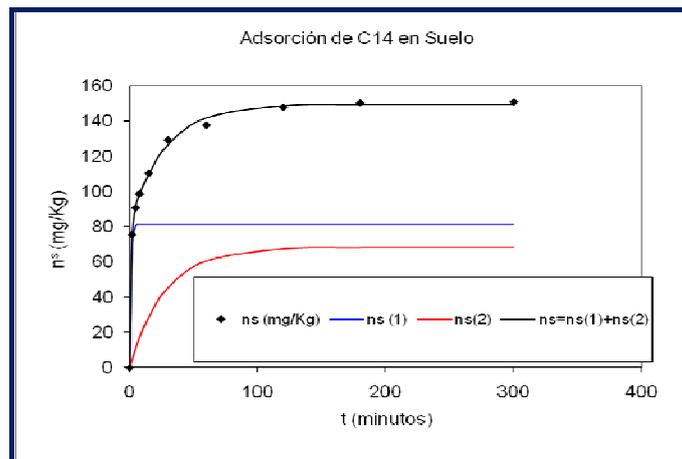


Figura 8.18- Cinéticas de los procesos de absorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₄.

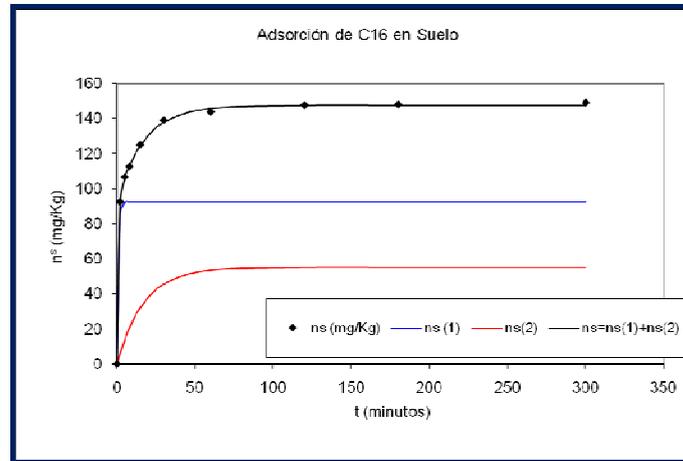


Figura 8.19- Cinéticas de los procesos de absorción 1, 2 y global para el homólogo C_{16} .

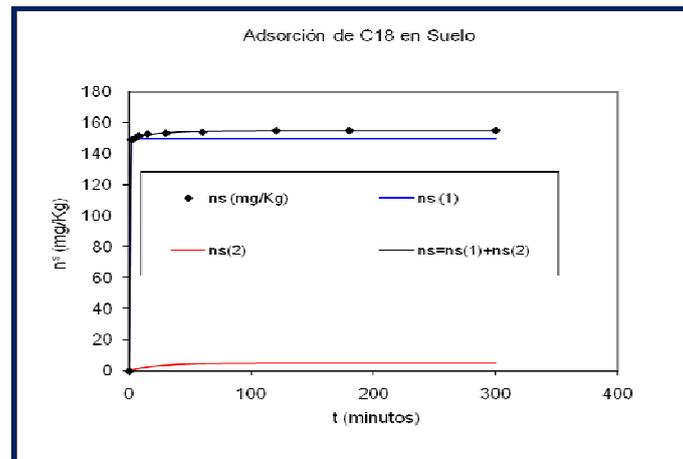


Figura 8.20- Cinéticas de los procesos de absorción 1, 2 y global para el homólogo C_{18} .

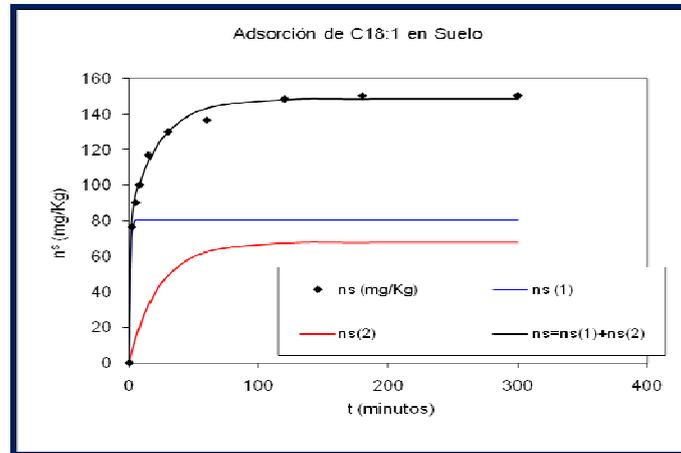


Figura 8.21- Cinéticas de los procesos de adsorción 1, 2 y global para el homólogo $C_{18:1}$.

La observación de las anteriores gráficas, pone de manifiesto la contribución de los dos “procesos sencillos” de adsorción-desorción postulados en cada homólogo y el proceso global que es el resultado de la suma de los mismos. El más rápido (mayor k_{ads}) se puede asignar a la adsorción en la superficie más externa del sólido adsorbente; y el más lento a la adsorción en el interior de los poros (puesto que ello implica una etapa de difusión). No se aprecia la posible contribución de la precipitación del adsorbible (por las razones que ya se anticiparon).

A partir de los datos obtenidos mediante el ajuste de las cinéticas, se han obtenido los valores de n_m^s (expresados en mg de jabón por Kg de suelo) correspondientes a cada uno de los procesos sencillos de adsorción/desorción, así como el global que se muestran en la **Tabla 8.15**, en donde se recogen también los valores de las constantes de adsorción k_{ads} de los dos procesos sencillos.

Tabla 8.15- Valores de n_m^s y k_a para los procesos de adsorción.

	C ₁₂ -Na	C ₁₄ -Na	C ₁₆ -Na	C ₁₈ -Na	C _{18:1} -Na
$n_{m(1)}^s$ (mg·kg ⁻¹)	53.838	1.190	92.480	149.802	80.436
$n_{m(2)}^s$ (mg·kg ⁻¹)	50.018	68.377	55.126	5.101	67.968
n_m^s (mg·kg ⁻¹)	103.857	149.567	147.607	154.903	148.404
$k_{ads(1)}$	0.940	1.023	1.359	2.471	1.056
$k_{ads(2)}$	0.028	0.036	0.058	0.045	0.042

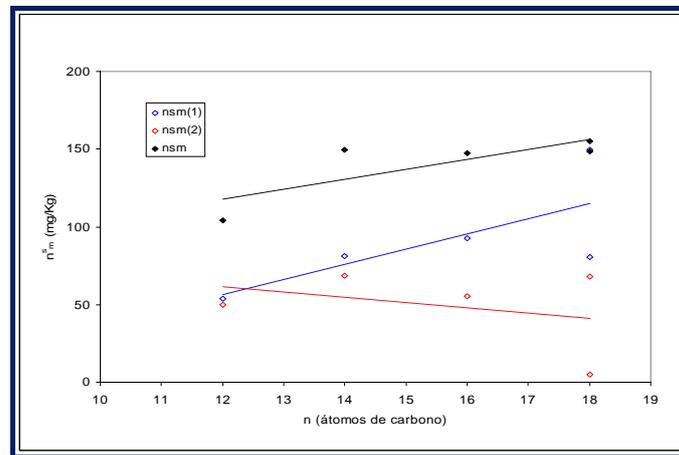


Figura 8.22- Valores de n_m^s en función del número de átomos de carbono de la cadena del jabón.

De la observación de la **Figura 8.22**, donde se representa n_m^s en función del número de átomos de carbón de la cadena se deduce que $n_{m(1)}^s$, $n_{m(2)}^s$ y n_m^s varían en función de la longitud de la misma. Si las cadenas son lineales, el tamaño de la molécula aumenta a medida que lo hace el número de átomos de carbono, con lo que, a su vez, aumenta la energía de la unión a los centros activos del suelo, mediante fuerzas de Van der Waals. En tal caso, cabe esperar que a medida que aumenta el número (n)

de átomos de carbono lo haga también $n_{m(1)}^s$ (por el citado aumento de energía de la unión adsorbido-adsorbente) y que disminuya el valor de $n_{m(2)}^s$ (pues el mayor tamaño de la molécula de jabón dificulta su difusión al interior de los poros); los resultados experimentales representados en la mencionada son coherentes con esta hipótesis.

En el caso del $C_{18:1}$, la existencia de un doble enlace entre los C_9 y C_{10} provoca que su comportamiento sea más parecido a los homólogos de cadena más corta como el C_{14} y C_{16} que al propio C_{18} ; naturalmente eso hace que disminuyan tanto la energía de las uniones por fuerzas de Van der Waals (con la consiguiente disminución del valor de $n_{m(1)}^s$) como su radio efectivo, lo cual facilita su penetración en los poros (razón por la cual su $n_{m(2)}^s$ es mayor que el encontrado para el C_{18}). En las **Figuras 8.20 y 8.21**, se aprecia la diferencia de comportamiento entre C_{18} y $C_{18:1}$; mientras que en primero de ellos la contribución de la adsorción en el interior de los poros es prácticamente despreciable, en el $C_{18:1}$ es muy significativa.

En cuanto a las velocidades específicas, k_{ads} , se refiere, éstas parecen aumentar a medida que lo hace la longitud de la cadena (ténganse en cuenta lo ya indicado de C_{18} respecto de $C_{18:1}$), siendo (como cabía esperar), mucho mayores las del proceso de adsorción en la superficie que las correspondientes a la adsorción en el interior de los poros.

D) Aplicación del modelo al estudio de las cinéticas de desorción

Teniendo en cuenta lo indicado para el proceso de adsorción, en las cinéticas de desorción se deberían distinguir otras dos isothermas individuales, correspondientes a la liberación del jabón adsorbido en la superficie más externa (mayor k_{des}) y a la liberación del adsorbido en los poros (con menor k_{des} , por la existencia de la etapa de difusión). Si la cantidad desorbida mediante uno de esos procesos fuera muy pequeña, la isoterma global coincidiría con una sola de las individuales, normalmente la primera mencionada.

Salvo en el caso del sistema Suelo-C₁₂ (en el que se observan de forma inequívoca los dos procesos sencillos anteriormente mencionados), los resultados experimentales se ajustan a uno solo de dichos procesos, lo que es indicativo de que la contribución del jabón adsorbido retenido en el interior de los poros es prácticamente despreciable. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la difusión hacia el exterior es menos probable a medida que aumenta la longitud de la cadena del ácido graso del jabón.

En las **Figuras 8.23 a 8.27**, se muestra la aplicación del modelo propuesto a las isothermas cinéticas de desorción, en donde se ha realizado el ajuste de los datos experimentales a la ecuación (8.28).

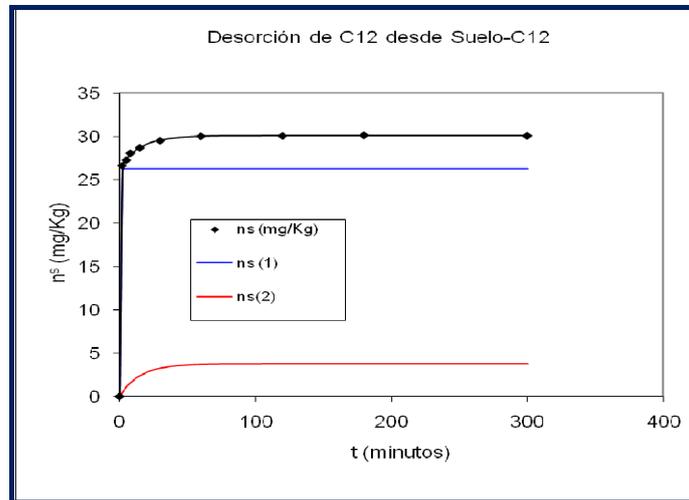


Figura 8.23- Cinéticas de los procesos de desorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₂.

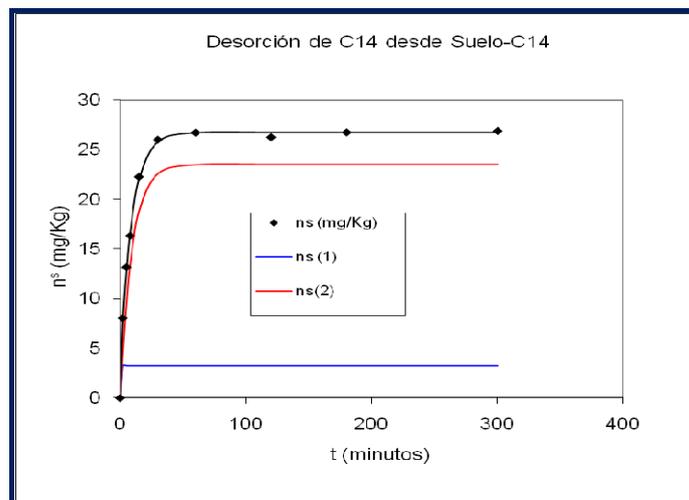


Figura 8.24- Cinéticas de los procesos de desorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₄.

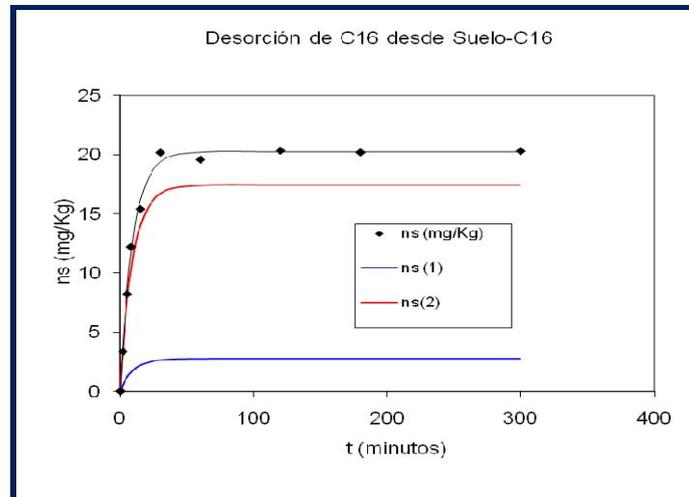


Figura 8.25- Cinéticas de los procesos de desorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₆

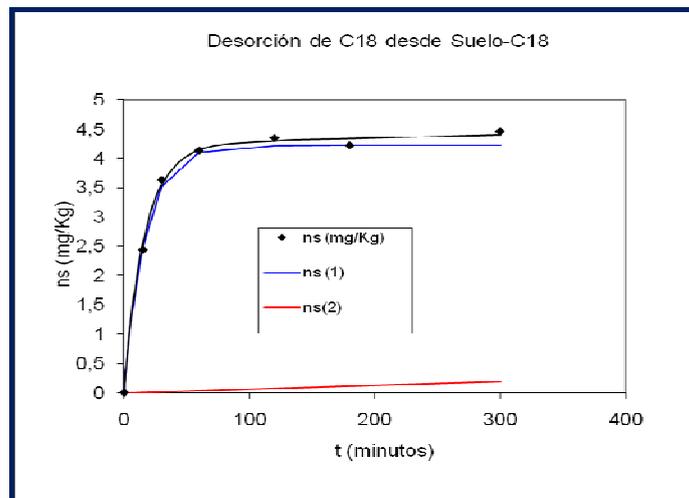


Figura 8.26- Cinéticas de los procesos de desorción 1, 2 y global para el homólogo C₁₈

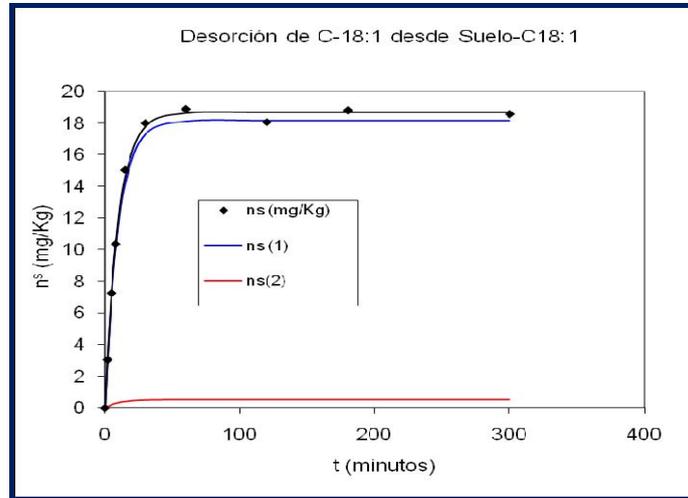


Figura 8.27- Cinéticas de los procesos de desorción 1, 2 y global para el homólogo C_{18:1}.

A partir de los datos obtenidos mediante el ajuste de las isotermas cinéticas se han obtenido los valores de n_m^s (expresados en mg de jabón por Kg de suelo) correspondientes a cada uno de los procesos sencillos de desorción, así como el global que se muestran en la **Tabla 8.16**, en donde se recogen también los valores de las constantes de desorción, k_{des} , de los dos procesos sencillos.

Tabla 8.16- Valores de n_m^s y k_{des} . Considerando dos procesos de desorción.

	C ₁₂ -Na	C ₁₄ -Na	C ₁₆ -Na	C ₁₈ -Na	C _{18:1} -Na
$n_{m(1)}^s$ (mg·kg ⁻¹)	26.276	3.203	2.782	4.221	18.141
$n_{m(2)}^s$ (mg·kg ⁻¹)	3.790	23.470	17.460	0.233	0.532
n_m^s (mg·kg ⁻¹)	30.066	26.673	20.242	4.454	18.673
$k_{des(1)}$	2.588	216.300	0.106	0.060	0.102
$k_{des(2)}$	0.068	0.108	0.106	0.001	0.102

Si, como se comentó con anterioridad, sólo consideramos un único proceso de desorción, los ajustes correspondientes se muestran en las **Figuras 8.28 a 8.31** y los datos calculados de n_m^s y k_{aes} en la tabla **Tabla 8.17**.

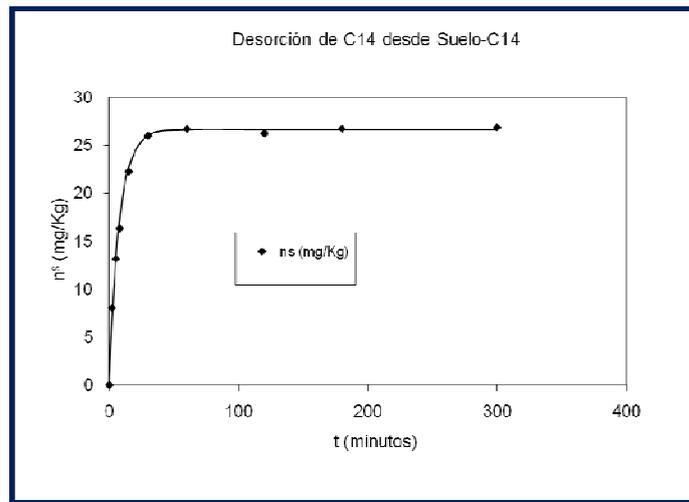


Figura 8.28- Isoterma cinética del proceso de desorción para el homólogo C_{14} .

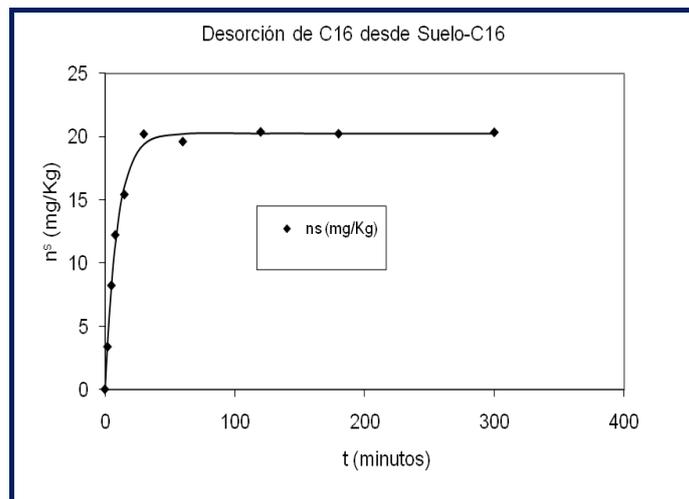


Figura 8.29- Isoterma cinética del proceso de desorción para el homólogo C_{16} .

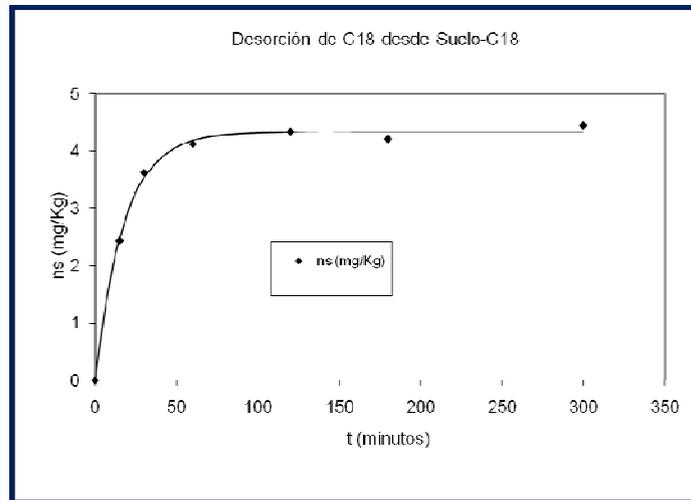


Figura 8.30- Isoterma cinética del proceso de desorción para el homólogo C_{18} .

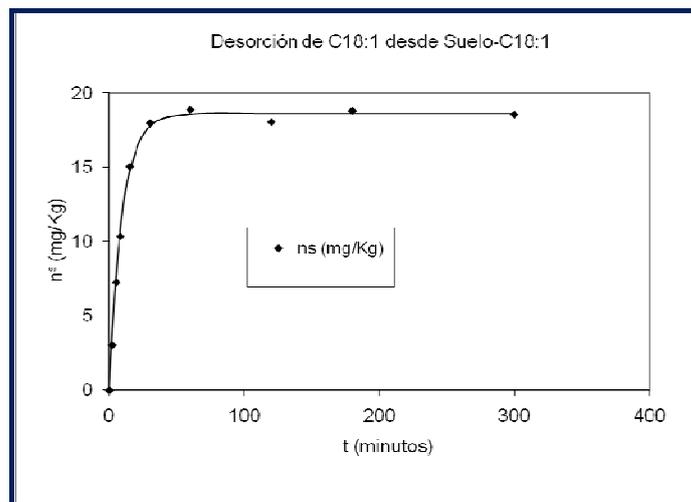


Figura 8.31- Isoterma cinética del proceso de desorción para el homólogo $C_{18:1}$.

Tabla 8.17- Valores de n_m^s y k_{des} . Considerando un proceso de desorción.

	C ₁₄ -Na	C ₁₆ -Na	C ₁₈ -Na	C _{18:1} -Na
n_m^s (mg·kg ⁻¹)	26.569	20.242	4.303	18.642
k_{des}	0.125	0.106	0.057	0.102

En la **Figura 8.32**, se han representado los valores de n_m^s frente al número de átomos de carbono de la cadena del jabón.

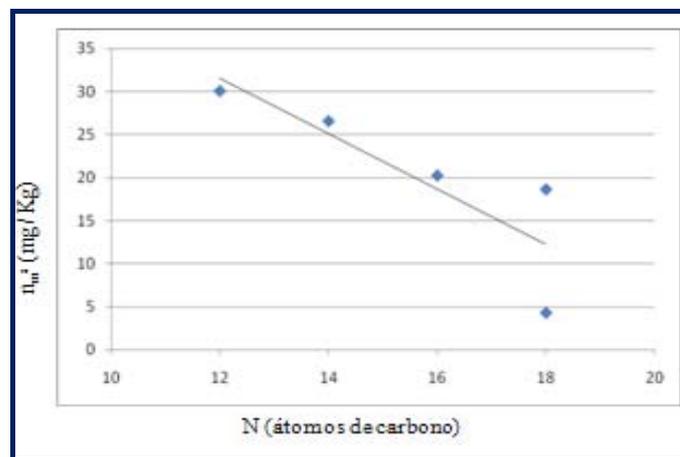


Figura 8.32- Valores de n_m^s en función del número de átomos de carbono de la cadena del jabón.

En cuanto a las velocidades específicas de desorción, k_{des} , estas disminuyen a medida que lo hace la longitud de la cadena (ténganse en cuenta lo ya indicado de C₁₈ respecto de C_{18:1}).

E) Aplicación del modelo al establecimiento de las isothermas en equilibrio

La isoterma de adsorción parece ser el resultado de la contribución de las tres isothermas individuales correspondientes a los tres procesos “sencillos” postulados, n (3) corresponde con la precipitación.

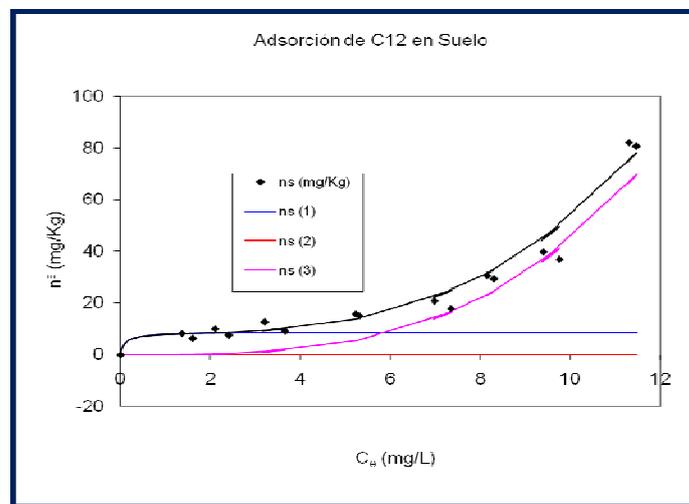


Figura 8.33- Isothermas de adsorción en el equilibrio para el sistema C_{12} -Suelo.

Asimismo, en la isoterma de desorción se puede considerar la contribución de esos mismos tres procesos sencillos.

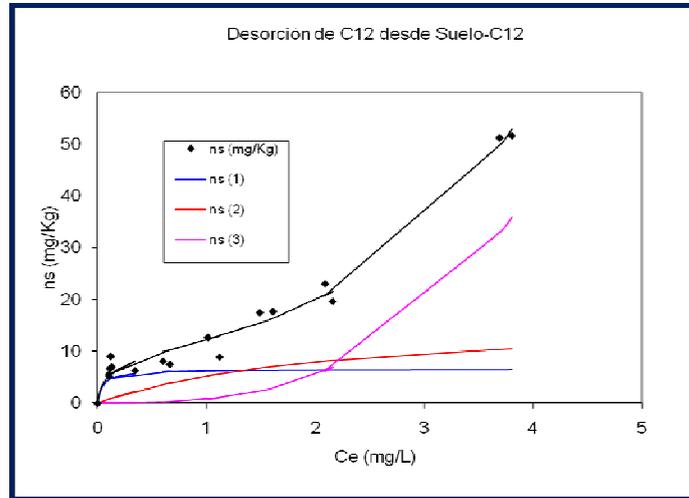


Figura 8.34- Isotermas de desorción en el equilibrio para el sistema C_{12} -Suelo.

Los dos procesos sencillos de adsorción/desorción reversible (al igual que se ha dicho en la cinética) se pueden asignar a la adsorción en la superficie más externa (mayor k_{des}) y en el interior de los poros.

Cuando se representan conjuntamente las isoterma de adsorción y de desorción netas, **Figura 8.33**, se pone de manifiesto la existencia de un efecto de histéresis en la liberación del adsorbido, lo que sugiere una apreciable afinidad neta del adsorbente por el adsorbido. Sufriendo un “retraso” importante la liberación del jabón retenido en el interior de los poros (lo cual es coherente con lo observado a la vista de los resultados del estudio cinético).

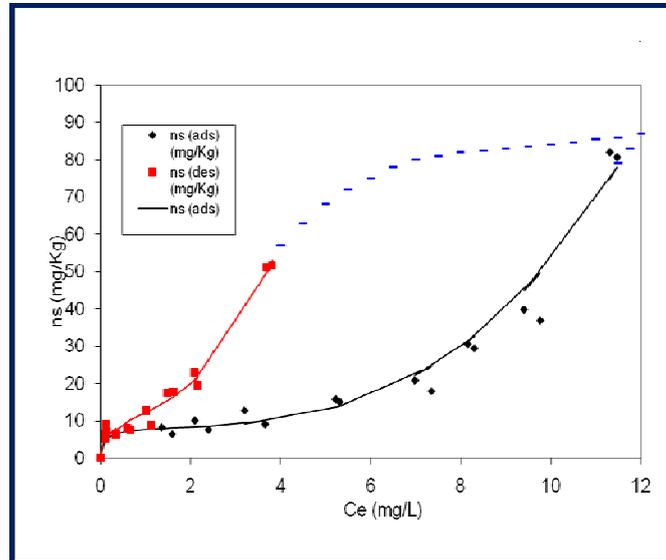


Figura 8.35- Representación conjunta de las isoterma correspondientes a los procesos globales de adsorción y desorción.

El mencionado efecto de histéresis parece ser muy significativo, sugiriendo que (a pesar de que no se adsorbe mucho jabón, ni con gran energía) la liberación es sólo parcial, reteniendo con una cierta energía una parte muy significativa del jabón inicialmente adsorbido.

La elevada área del ciclo de histéresis puede tener una explicación razonable: a medida que se diluye la disolución en equilibrio con Suelo-C₁₂ se va disolviendo el jabón precipitado en la superficie, pasando a la fase disolución; y desde ésta es adsorbido por el suelo, pasando, por difusión, al interior del mismo.

3.2 - Experiencia en continuo (columna)

Las experiencias en continuo consistieron en el paso de disolución de jabón a través de una columna de suelo, a temperatura constante, con el fin de obtener la curva de rotura del lecho y así calcular la cantidad de jabón retenida y compararla con los estudios en discontinuo.

Las ventajas que presentan las experiencias en columnas en comparación con las de tanque son: 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 retención en columna, es de gran utilidad determinar la retención en tanque, porque ayuda a diseñar las experiencias en columna y a ajustar las condiciones operativas (caudal, concentración, cantidad de suelo, etc.)

3.2.1 - Descripción de la instalación experimental

Las columnas se prepararon vaciando cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) y rellenándolos de suelo mediante el uso 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 ($1.39 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Tanto en la parte inferior como en la superior, se colocaron las fritas de vidrio del cartucho de extracción en fase sólida. En la parte superior se colocó también un tapón de polipropileno en cuyo centro existe un orificio por el cual se introdujo un tubo de teflón de 1 mm de diámetro interior, por donde circuló el efluente.

En la **Figura 8.36**, se muestra el aspecto de las columnas utilizadas.



Figura 8.36- Columnas con las que se realizaron los ensayos.

La instalación experimental utilizada constaba de una bomba peristáltica *ISMATEC ISM 834 A*. 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 de $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de jabón de coco, cuya distribución de homólogos se muestra en la **Tabla 8.18**.

HOMÓLOGOS	%
C ₁₂ -Na	47.93
C ₁₄ -Na	19.39
C ₁₆ -Na	10.67
C _{18:1} -Na	18.69
C ₁₈ -Na	3.32

Tabla 8.18- Distribución por homólogos del jabón de coco.

La disolución de jabón estaba contenida en un recipiente donde estaba sumergido el tubo de succión de la entrada de la bomba. Las muestras del efluente se recogían por conteo de gotas, con la ayuda de un colector automático que se programó previamente, en tubos de ensayo graduados.

De estos tubos de ensayo graduados, se recogía rápidamente parte de la fracción líquida (10 mL), que posteriormente era diluida con 0.5 mL de patrón interno para su posterior análisis por HPLC con detección con DAD. Como referencia, también se sometía 10 mL de la disolución del influente junto con otro 0.5 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 las experiencias en discontinuo. En la **Figura 8.37**, se representa un esquema de la instalación de los aparatos necesarios para efectuar esta experiencia.

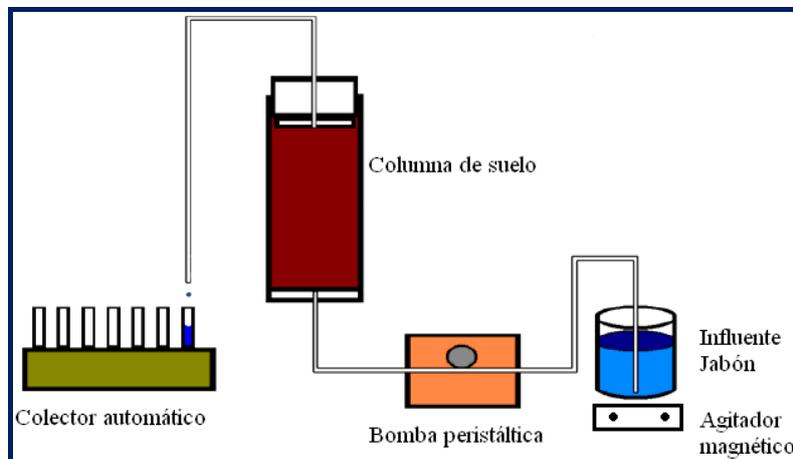


Figura 8.37- Esquema de la instalación experimental.

En la **Figura 8.38**, se muestra una imagen real de la instalación.



Figura 8.38- Vista del montaje utilizado para la realización de las experiencias en columna.

3.2.2 - Columnas ensayadas

La representación gráfica de los resultados experimentales de la concentración del efluente frente a su volumen, constituye la curva de rotura del lecho para cada homólogo estudiado. Se comenzó con una columna preparada con 3 g de suelo, en la **Tabla 8.19**, se detallan sus características.

PARÁMETRO	MAGNITUD
Diámetro	12 mm
Longitud	20 mm
Cantidad de suelo	3 g
Flujo	0.166 mL·min ⁻¹
Tamizado del suelo	2 mm
Volumen de las fracciones	5 mL/tubo

Tabla 8.19- Características de la columna.

El resultado se muestra en la *Figura 8.39*.

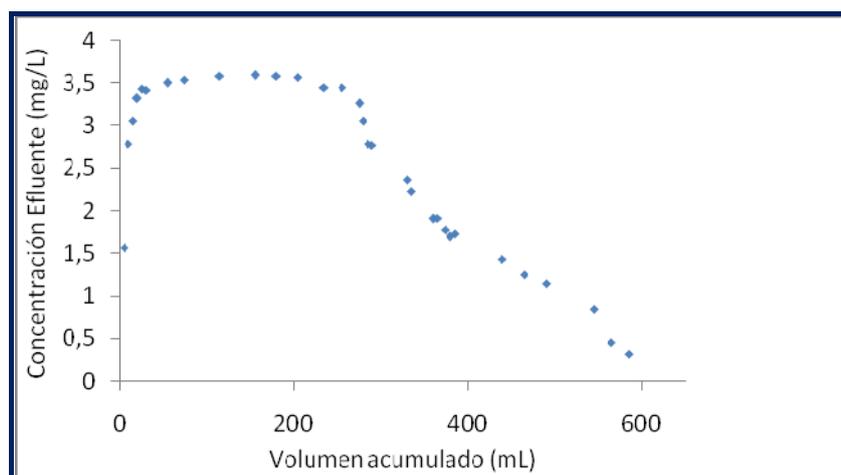


Figura 8.39. Curva de rotura obtenida para la columna de 3 g de suelo.

Para esta columna de 3 g de suelo se observa que sólo eluye el homólogo C₁₂-Na, el cual tras pasar una meseta de estabilización, comienza a disminuir su concentración debido a la disminución del flujo de la columna por su obstrucción, a consecuencia de la acumulación de las sales

cálcicas del jabón, **Figura 8.40**. Esta disminución del flujo propicia un mayor tiempo de contacto con el suelo y por tanto una mayor retención.



Figura 8.40- *Detalle de la acumulación de jabón cálcico precipitado en la cabeza de la columna.*

Para tratar de obtener las curvas de rotura de los demás homólogos y evitar su obturación, se prepararon columnas con cantidades de suelo inferiores: 2 g y 1 g respectivamente. En ellas se observó un comportamiento similar. Estos hechos están en total concordancia con el modelo de adsorción/desorción propuesto en el apartado anterior, donde se pone de manifiesto la gran tendencia que tiene el jabón a precipitar en presencia de sales cálcicas.

4 - EXPERIENCIA EN CAMPO

Este estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el comportamiento del jabón en un determinado ambiente natural, donde puede ser aportado por diferentes mecanismos, siendo empleada para esta finalidad, la irrigación forzada.

Para la realización de las todas las experiencias llevadas a cabo en el campo, fue necesario la realización de algunas experiencias 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 m², ha sido subdividida en subparcelas de 4 m², una de las cuales se han utilizado para los ensayos con formulación de jabón de coco comercial con composición indicada anteriormente. Un aspecto de las subparcelas se muestra en la *Figura 8.41*.



Figura 8.41 - Vista general de las parcelas experimentales.

Para medir la temperatura, tanto del suelo como la ambiental, se utilizó una sonda Aquacheck provista de seis termómetros digitales y un sensor de humedad. Los termómetros fueron situados, el primero en la superficie para medir la temperatura ambiental y los demás a profundidades de 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 y 50.0 cm respectivamente. Las medidas de temperatura y humedad se registraron cada media hora durante todo el tiempo que dura la experiencia. Los datos fueron descargados cada semana a un datalogger y posteriormente transferidos al fichero correspondiente del programa en un PC.



Figura 8.42- Vista general de la sonda Aquacheck en la parcela.

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 Fe, en las cercanías de la Finca de Santa María.

4.2 - Ensayo con jabón

4.2.1 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de suelo

Ante la ausencia de jabón en las muestras de agua de pozo empleada en los riegos y como estudio preliminar, se procedió a analizar columnas de suelo tomadas con anterioridad a 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 60 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 5 mL de disolución de formaldehído 1% (m/v) - (**Figura 8.43**). 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 un tamiz de 2

mm. Las muestras se introdujeron en frascos estériles, conservadas a 4 °C hasta su análisis.



Figura 8.43- Colecta de las muestras de suelo en la parcela agrícola.

La toma de muestra se realizó sistemáticamente a las ocho de la mañana antes de aplicar cada riego.

4.2.2 - Estudio estacional

Una vez puesta a punto la metodología para la toma de muestra y análisis de jabón 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 experiencias anteriores y ante la ausencia de jabón encontrada por debajo de los primeros 20 cm de profundidad, se decidió incrementar la cantidad de jabón aplicada con objeto de establecer su comportamiento en capas más profundas. En cada tratamiento se especifica la cantidad aportada (próxima a los $5.0 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$). Además, esta nueva cantidad empleada supondría una exposición del suelo al jabón 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 unas concentraciones en disolución próximas la cantidad empleada en este estudio. Este hecho representaría una mayor garantía, en cuanto al comportamiento del jabón, en el caso de una supuesta y drástica aportación en este ambiente.

Con relación al riego empleado en las distintas campañas de este estudio y basándonos en experiencias anteriores, se realizó un riego diario. Asimismo, se realizó un riego preliminar con anterioridad a la aplicación del jabón. Con objeto de prevenir fenómenos de flujo preferencial en grietas y canales que limitarían una interacción entre la solución y el suelo, *White⁶ et col.* observaron este efecto con los herbicidas bromacilo y napropamida, en ensayos en columnas de suelo intactas.

En las parcelas estudiadas no se había utilizado previamente ningún tipo de pesticidas, herbicidas, insecticida en los últimos cinco años. Esta condición es muy importante, porque no sólo en estos productos pueden contener tensioactivos en sus respectivas formulaciones, aportándolo al medioambiente

⁶ 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

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 jabón 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). Antes de cada tratamiento estacional, se procedió a realizar un blanco a las diferentes profundidades con objeto de conocer la posible existencia de jabón residual en el suelo. El tiempo empleado en cada experiencia fue el necesario para que la concentración de jabón alcanzase un valor próximo al encontrado en el blanco (cantidad residual de jabón persistente en el suelo).

Las temperaturas del suelo fueron tomadas por la sonda Aquacheck de forma programada cada media hora durante el tiempo de ensayo. En las gráficas correspondientes se muestran los valores obtenidos.

A) Verano 2008

Este primer ensayo fue importante para dilucidar tanto la frecuencia con que se deberían realizar las colectas, la profundidad y la frecuencia de riego con agua de pozo.

La experiencia fue realizada en el periodo comprendido entre el día 22/07/2008 hasta el día 11/09/2008, siendo la dosis de jabón aplicada en la parcela de $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Para esto fueron pesadas 20 g de la mezcla comercial de jabón de coco (sintetizada en el laboratorio a partir de ácidos grasos de coco), y aplicadas a la parcela. A diferencia del resto de

aplicaciones y con objeto de determinar las condiciones ideales de riego, la frecuencia de regado fue de dos diarios durante los primeros días del ensayo, para luego pasar a un solo riego al día, manteniendo esa frecuencia para el resto de estaciones. La dotación por riego era de $131.75 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$.

En este tratamiento se realizaron 13 colectas, diariamente durante los cuatro primeros días, con una periodicidad de dos días las siguientes, y una vez a la semana las cinco últimas tomas.

A.1) Evolución de los parámetros ambientales

Los datos obtenidos de las medida de la temperatura y humedad a las diferentes profundidades (ambiental, a 10.0, 20.0, 30, 40 y 50.0 cm de profundidad) se muestra en la *Figura 8.44 y 8.45*.

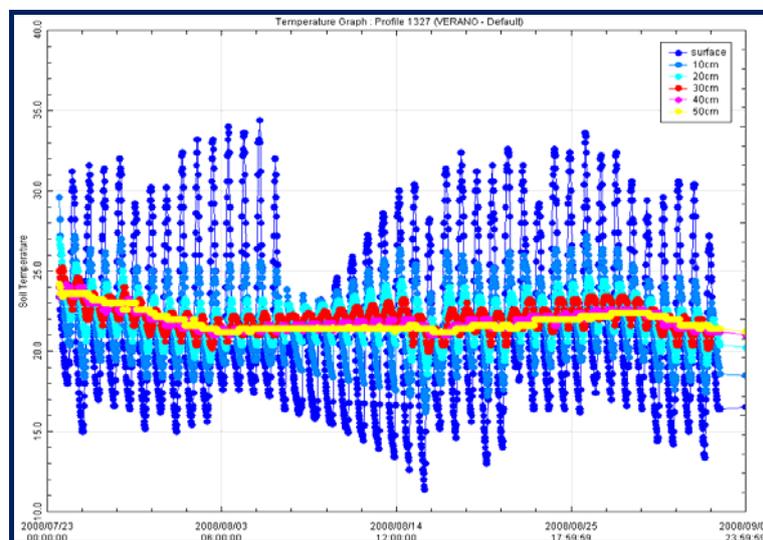


Figura 8.44- Temperaturas a diferentes profundidades.

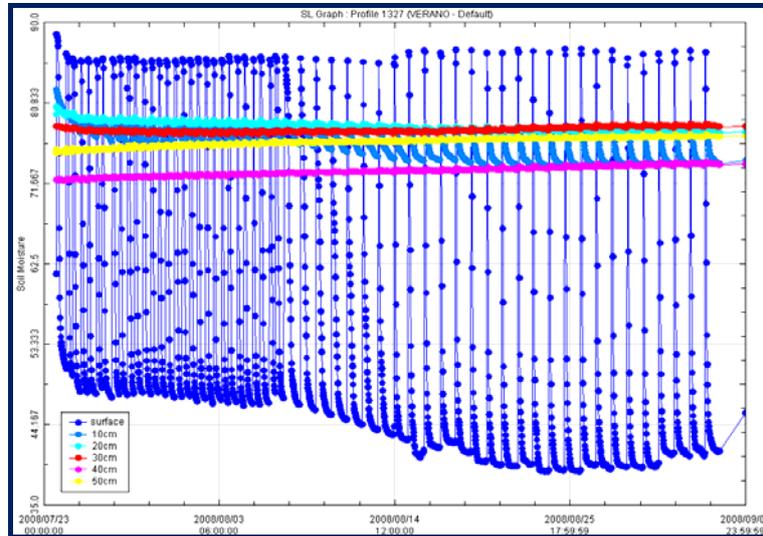


Figura 8.45- Humedades a diferentes profundidades.

Se observa que la variabilidad disminuye al aumentar la profundidad. Esta observación fue común en todos los tratamientos. En la **Tabla 8.20**, se muestran los parámetros ambientales.

Tabla 8.20 - Parámetros ambientales para el tratamiento de Verano 2008.

PARÁMETROS AMBIENTALES			
Temperatura ambiente (°C) Máx. Med. Mín.			Temperatura media a 2 cm de profundidad (°C)
33.5	24.6	15.3	21.4
Precipitación total de lluvia y/o nieve derretida (mm)			Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)
7.5			21.7
Velocidad media del viento (km·h⁻¹)			Temperatura media a 20 cm de profundidad
7.3			22.0
Humedad ambiental (%)			45.2
Humedad media a 2 cm de profundidad (%)			52.2
Humedad media a 10 cm de profundidad (%)			76.2
Humedad media a 20 cm de profundidad (%)			78.2

A.2) Evaluación del jabón

Los resultados obtenidos en los análisis de las diferentes muestras de suelo se representan en la *Figura 8.46*.

Verano 2008

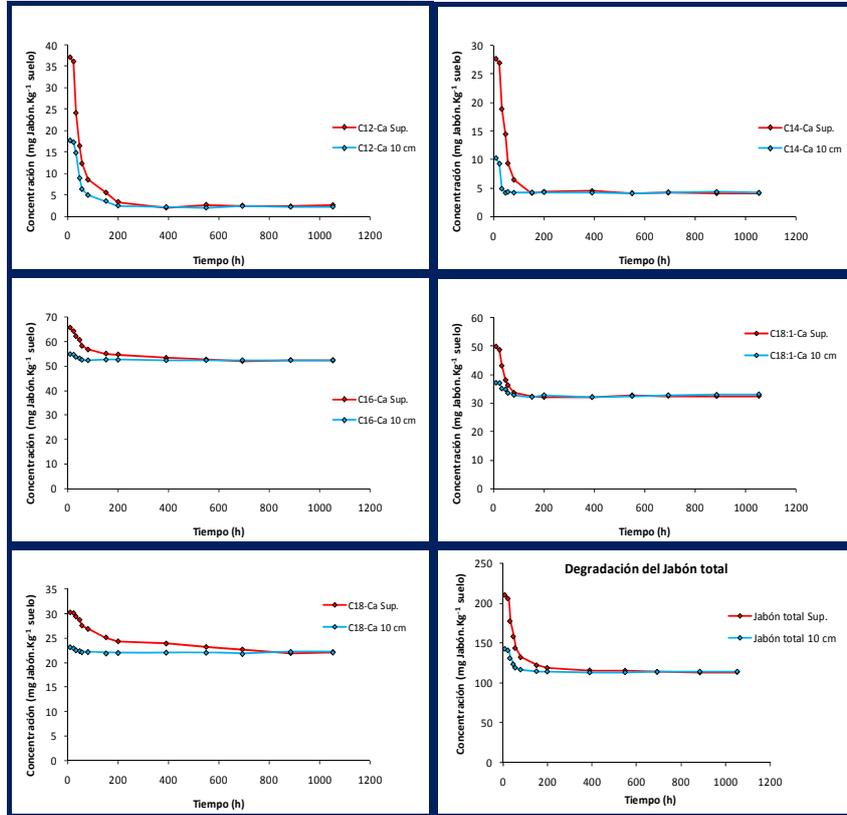


Figura 8.46- Concentraciones de los homólogos y jabón total a distintas profundidades y tiempos.

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 8.21**.

Homólogo C12-Ca			Homólogo C14-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0374	0.0223	k (h ⁻¹)	0.0275	0.0136
t _{1/2} (h)	18.53	31.08	t _{1/2} (h)	25.01	50.97
R ² (%)	97.2	96.4	R ² (%)	95.7	83

Homólogo C16-Ca			Homólogo C18:1-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0167	0.0056	k (h ⁻¹)	0.0406	0.0106
t _{1/2} (h)	41.51	123.78	t _{1/2} (h)	17.07	65.39
R ² (%)	96.9	95	R ² (%)	94.1	91.8

Homólogo C18-Ca			Jabot total		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0071	0.004	k (h ⁻¹)	0.0258	0.0221
t _{1/2} (h)	97.63	173.29	t _{1/2} (h)	26.87	31.36
R ² (%)	94.8	96.7	R ² (%)	98.7	95.4

Tabla 8.21 - Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos C₁₂; C₁₄; C₁₆; C_{18:1}; C₁₈ y jabón total.

En las **Figuras 8.47 y 8.48**, se muestra el comportamiento del jabón y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) con la longitud de la cadena de los distintos homólogos y con las dos profundidades estudiadas. A partir de 20 cm no se detectó cantidad alguna de los analitos objetos de estudio. Este hecho se observó también en las demás campañas. El hecho de someter la parcela experimental a dos

riegos diarios condujo a serias dificultades en la toma de muestra debido al excesivo aporte de agua.

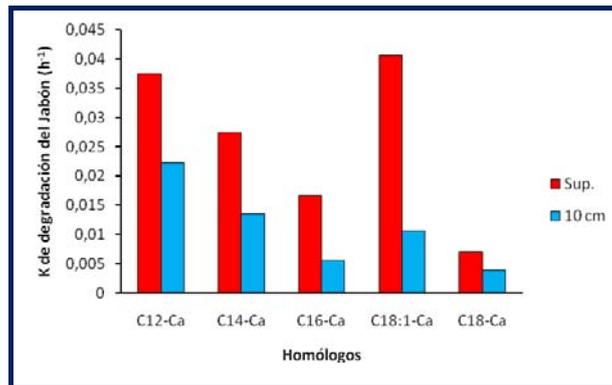


Figura 8.47- Relación entre la constante de degradación, la profundidad y la longitud de cadena.

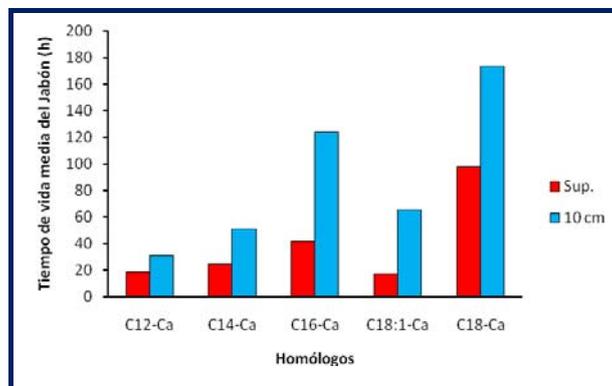


Figura 8.48- Relación entre el tiempo de vida media, la profundidad y la longitud de cadena.

B) Otoño 2008

En esta campaña, se operó de forma similar al tratamiento de verano, con el mismo aporte de jabón de coco y modificando la frecuencia de riego a 24 horas, por las razones indicadas en el apartado anterior.

Esta experiencia fue realizada desde el día 17/11/2008 hasta el día 18/12/2008, siendo la dosis de jabón aplicada en la parcela de $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Para esto fueron pesadas 20 g de la mezcla comercial de jabón y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue la indicada en el tratamiento anterior. En total se realizaron 8 colectas.

B.1) Evolución de los parámetros ambientales

En las *Figura 8.49 y 8.50*, se muestra los datos de temperaturas y humedad a las diferentes profundidades. Del mismo modo, en la *Tabla 8.22*, se muestran los parámetros ambientales.

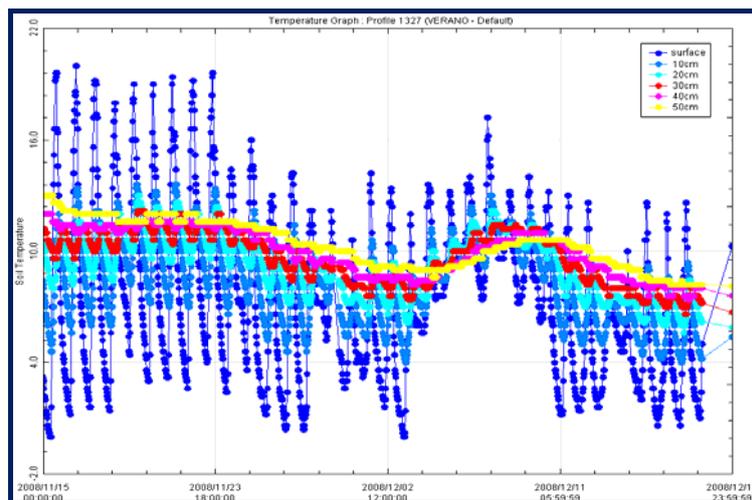


Figura 8.49- Temperaturas a diferentes profundidades.

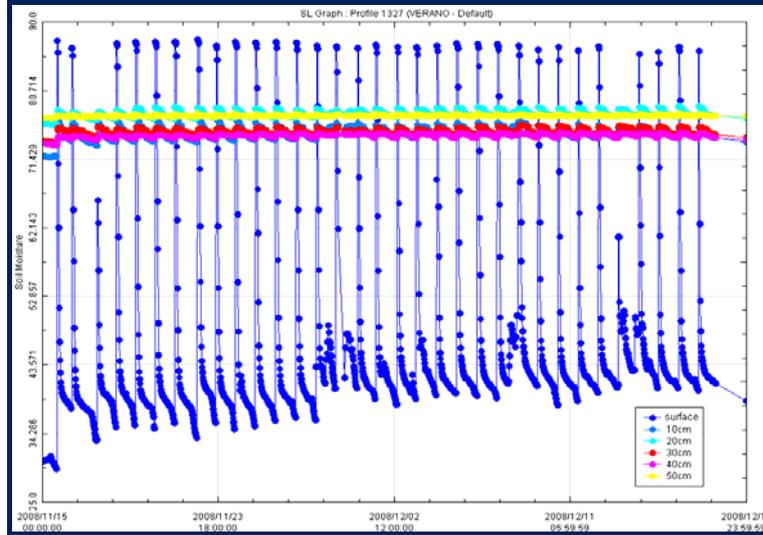


Figura 8.50- Humedades a diferentes profundidades.

Tabla 8.22- Parámetros ambientales para el tratamiento de Otoño 2008.

PARÁMETROS AMBIENTALES			
Temperatura ambiente (°C) Máx. Med. Mín.			Temperatura media a 2 cm de profundidad (°C)
11.4	5.7	0.8	
Precipitación total de lluvia y/o nieve derretida (mm)			Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C)
82.3			8.3
Velocidad media del viento (km·h⁻¹)			Temperatura media a 20 cm de profundidad
5.6			9.2
Humedad ambiental (%)			81.7
Humedad media a 2 cm de profundidad (%)			45.9
Humedad media a 10 cm de profundidad (%)			75.1
Humedad media a 20 cm de profundidad (%)			77.6

B.2) Evaluación del jabón

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la *Figura 8.51*.

Otoño 2008

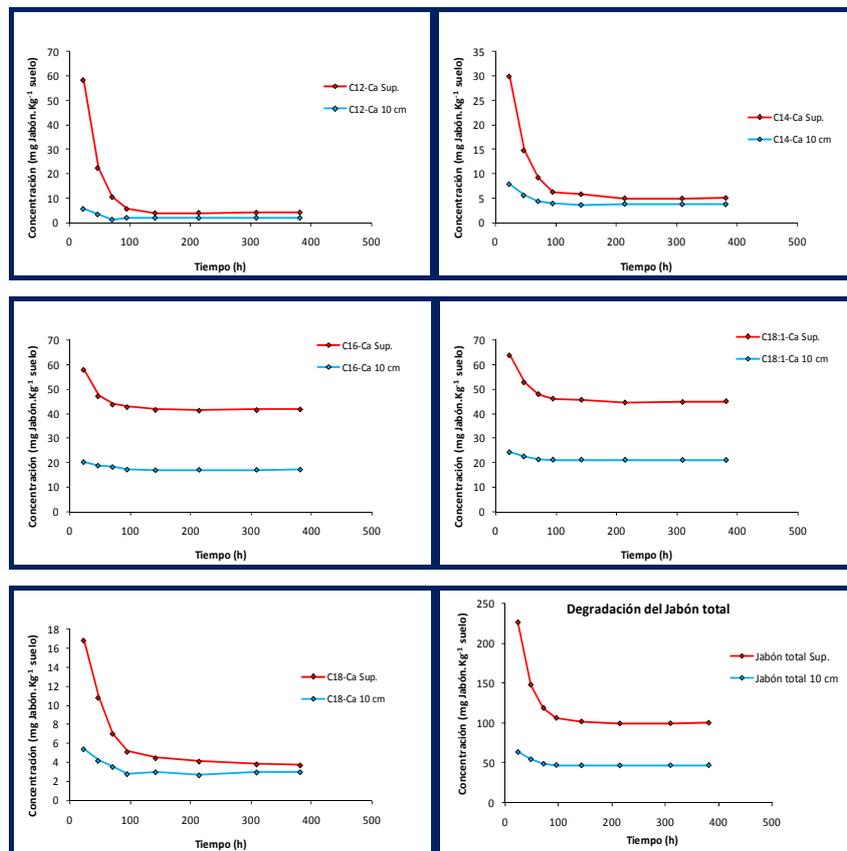


Figura 8.51- Concentraciones de los homólogos y jabón total a distintas profundidades y tiempos.

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 8.23**.

Homólogo C12-Ca			Homólogo C14-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0512	0.0448	k (h ⁻¹)	0.0432	0.0368
t _{1/2} (h)	13.54	15.47	t _{1/2} (h)	16.05	18.84
R ² (%)	99	95.5	R ² (%)	98	95.3

Homólogo C16-Ca			Homólogo C18:1-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0375	0.0292	k (h ⁻¹)	0.0402	0.0358
t _{1/2} (h)	18.48	23.74	t _{1/2} (h)	17.24	19.36
R ² (%)	85.1	97.6	R ² (%)	90.7	88.9

Homólogo C18-Ca			Jabón total		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0314	0.0268	k (h ⁻¹)	0.0424	0.0356
t _{1/2} (h)	22.07	25.86	t _{1/2} (h)	16.35	19.47
R ² (%)	99.4	99.4	R ² (%)	92.5	93.1

Tabla 8.25- Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos C₁₂; C₁₄; C₁₆; C_{18:1}; C₁₈ y jabón total.

En las **Figuras 8.52 y 8.53**, se muestra el comportamiento del jabón y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) con la longitud de la cadena de los distintos homólogos y con las dos profundidades estudiadas.

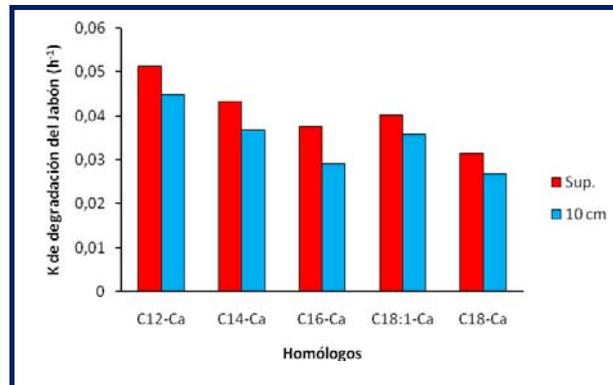


Figura 8.52- Relación entre la constante de degradación, la profundidad y la longitud de cadena.

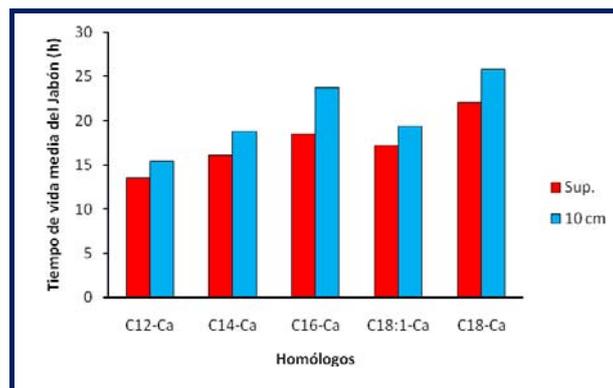


Figura 8.53- Relación entre el tiempo de vida media, la profundidad y la longitud de cadena.

C) Invierno 2009

En esta campaña, se operó de forma idéntica al tratamiento de otoño, con el mismo aporte de jabón de coco y la misma frecuencia de riego.

Esta experiencia fue realizada desde el día 24/02/2009 hasta el día 12/03/2009, siendo la dosis de jabón aplicada en la parcela de $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Para esto fueron pesadas 20 g de la mezcla comercial de jabón y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue la indicada en el tratamiento anterior. En total se realizaron 8 colectas.

C.1) Evolución de los parámetros ambientales

En las **Figura 8.54 y 8.55**, se muestra los datos de temperaturas y humedad a las diferentes profundidades. Del mismo modo, en la **Tabla 8.24**, se muestran los parámetros ambientales.

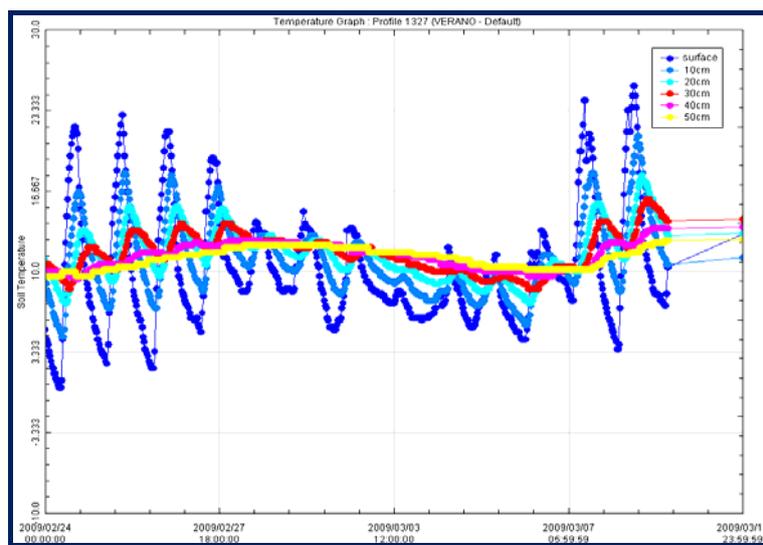


Figura 8.54- Temperaturas a diferentes profundidades.

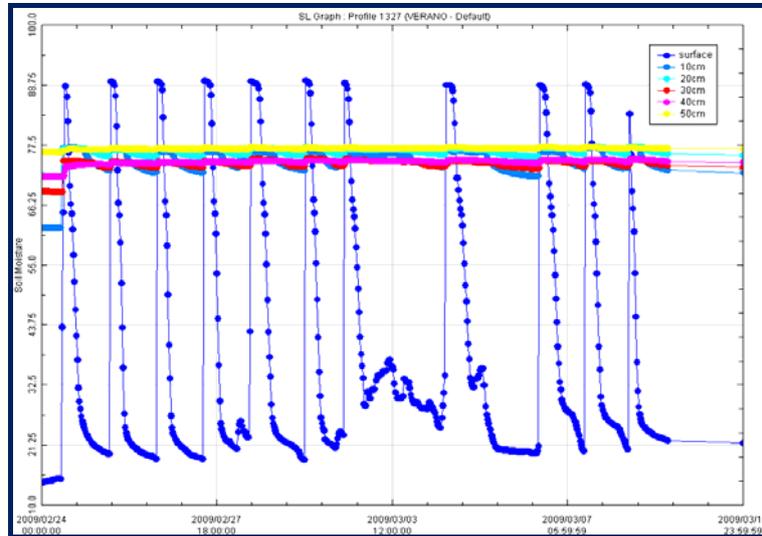


Figura 8.55- Humedades a diferentes profundidades.

Tabla 8.24- Parámetros ambientales para el tratamiento de Invierno 2009.

PARÁMETROS AMBIENTALES			
Temperatura ambiente (°C) Máx. Med. Mín.			Temperatura media a 2 cm de profundidad (°C) 10.1
16.2	10.1	4.4	
Precipitación total de lluvia y/o nieve derretida (mm) 52.0			Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C) 10.9
Velocidad media del viento (km·h⁻¹) 7.1			Temperatura media a 20 cm de profundidad 11.4
Humedad ambiental (%)			77.4
Humedad media a 2 cm de profundidad (%)			37.5
Humedad media a 10 cm de profundidad (%)			74.4
Humedad media a 20 cm de profundidad (%)			76.2

C.2) Evaluación del jabón

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la **Figura 8.56**.

Invierno 2009

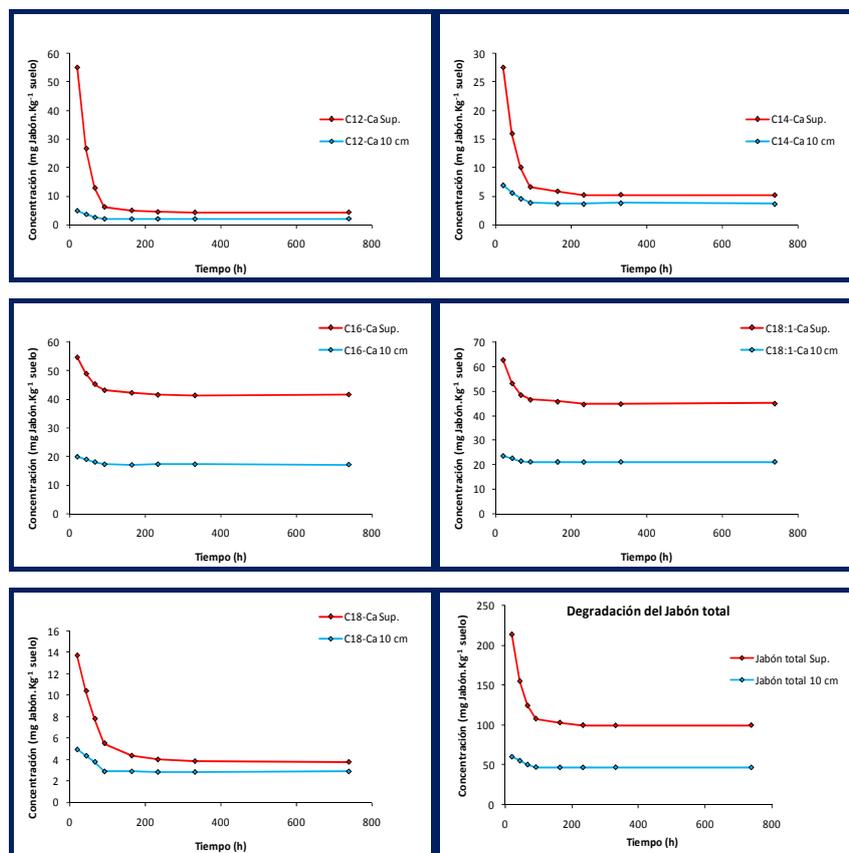


Figura 8.56- Concentraciones de los homólogos y jabón total a distintas profundidades y tiempos.

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 8.25**.

Homólogo C12-Ca			Homólogo C14-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h^{-1})	0.0461	0.0266	k (h^{-1})	0.0388	0.0246
$t_{1/2}$ (h)	15.04	26.06	$t_{1/2}$ (h)	17.86	28.18
R^2 (%)	99.9	98.8	R^2 (%)	99.5	99.4

Homólogo C16-Ca			Homólogo C18:1-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h^{-1})	0.0299	0.0180	k (h^{-1})	0.0350	0.0203
$t_{1/2}$ (h)	22.18	38.51	$t_{1/2}$ (h)	19.80	34.15
R^2 (%)	96.6	99.8	R^2 (%)	92.2	95

Homólogo C18-Ca			Jabón total		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h^{-1})	0.0238	0.0153	k (h^{-1})	0.0370	0.0213
$t_{1/2}$ (h)	29.12	45.30	$t_{1/2}$ (h)	18.73	32.54
R^2 (%)	90.4	96.8	R^2 (%)	96.6	99.2

Tabla 8.25- Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos C_{12} ; C_{14} ; C_{16} ; $C_{18:1}$; C_{18} y jabón total.

En las **Figuras 8.57 y 8.58**, se muestra el comportamiento del jabón y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) con la longitud de la cadena de los distintos homólogos y con las dos profundidades estudiadas.

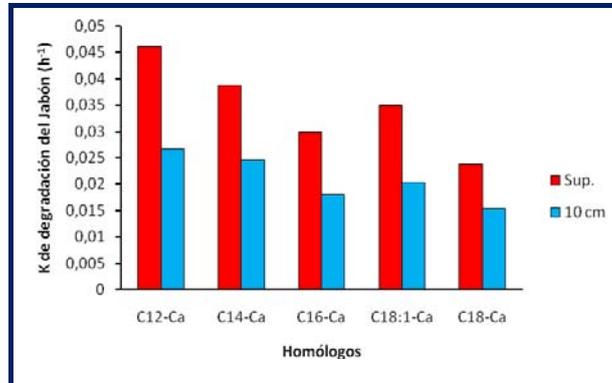


Figura 8.57- Relación entre la constante de degradación, la profundidad y la longitud de cadena.

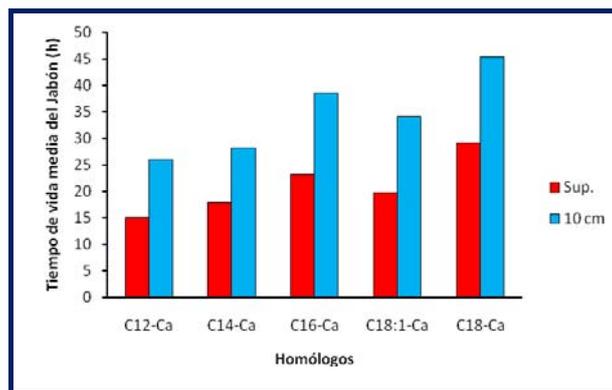


Figura 8.58- Relación entre el tiempo de vida media, la profundidad y la longitud de cadena.

D) Primavera 2009

En esta campaña, se operó de forma idéntica al tratamiento de otoño, con el mismo aporte de jabón de coco y la misma frecuencia de riego.

Esta experiencia fue realizada desde el día 26/05/2009 hasta el día 13/06/2009, siendo la dosis de jabón aplicada en la parcela de $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Para esto fueron pesadas 20 g de la mezcla comercial de jabón y aplicadas a la parcela. La dotación de riego fue la indicada en el tratamiento anterior. En total se realizaron 8 colectas.

D.1) Evolución de los parámetros ambientales

En las *Figura 8.59 y 8.60*, se muestra los datos de temperaturas y humedad a las diferentes profundidades. Del mismo modo, en la *Tabla 8.26*, se muestran los parámetros ambientales.

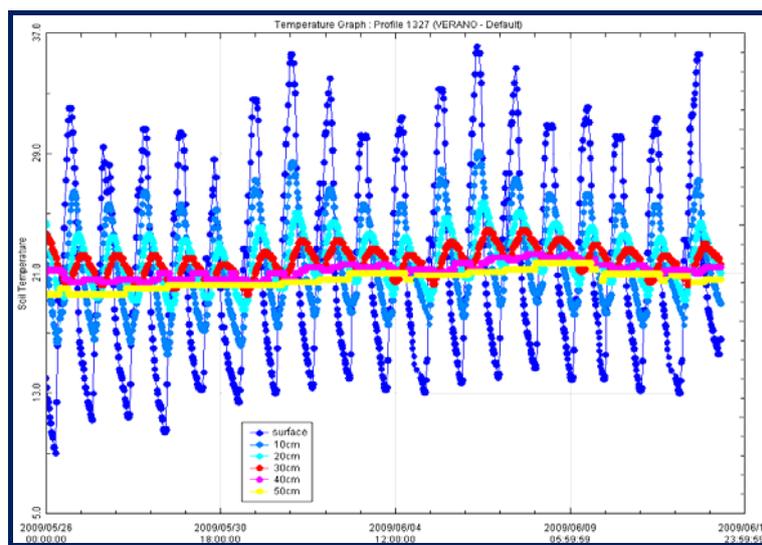


Figura 8.59- Temperaturas a diferentes profundidades.

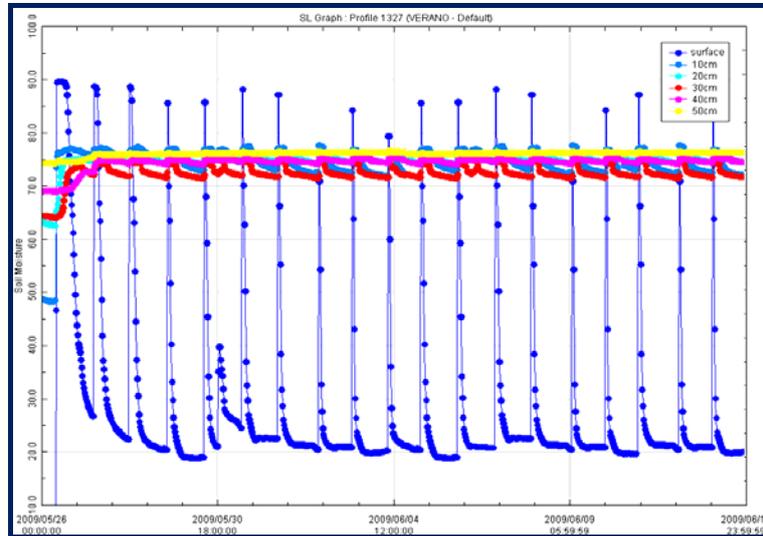


Figura 8.60- Humedades a diferentes profundidades.

Tabla 8.26- Parámetros ambientales para el tratamiento de Primavera 2009.

PARÁMETROS AMBIENTALES			
Temperatura ambiente (°C) Máx. Med. Mín.			Temperatura media a 2 cm de profundidad (°C) 20.7
29.4	20.9	11.8	
Precipitación total de lluvia y/o nieve derretida (mm) 19.2			Temperatura media a 10 cm de profundidad (°C) 21.2
Velocidad media del viento (km·h⁻¹) 8.1			Temperatura media a 20 cm de profundidad 21.6
Humedad ambiental (%)			49.3
Humedad media a 2 cm de profundidad (%)			29.5
Humedad media a 10 cm de profundidad (%)			73.8
Humedad media a 20 cm de profundidad (%)			74.7

D.2) Evaluación del jabón

En cuanto a los resultados obtenidos, éstos se encuentran representados en la **Figura 8.61**.

Primavera 2009

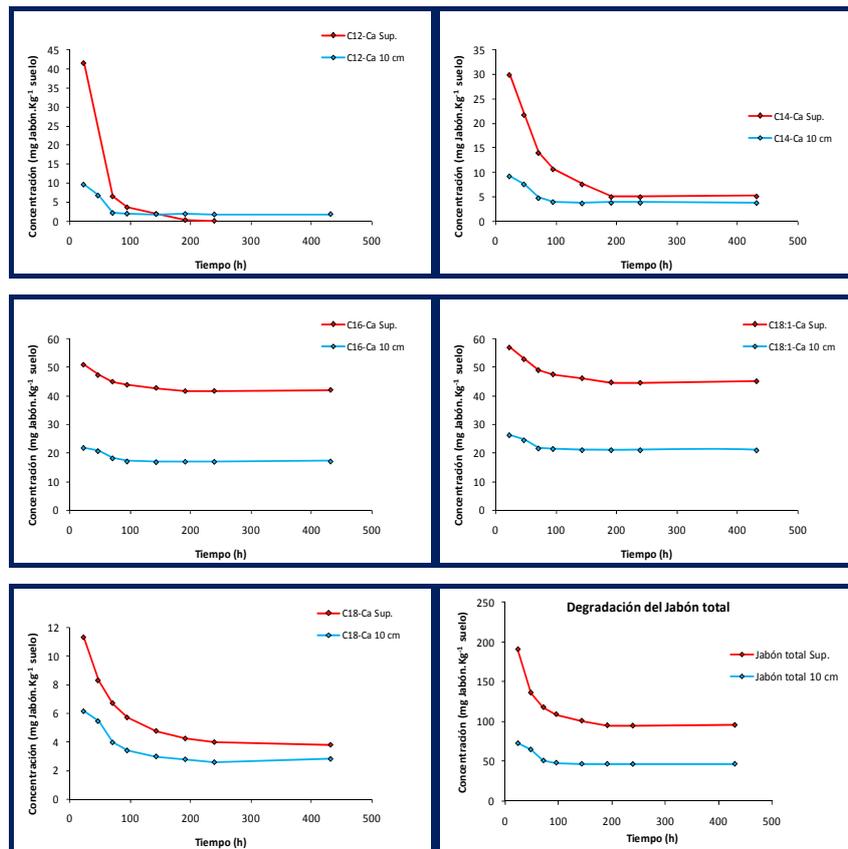


Figura 8.61- Concentraciones de los homólogos y jabón total a distintas profundidades y tiempos.

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 8.27**.

Homólogo C12-Ca			Homólogo C14-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0334	0.0197	k (h ⁻¹)	0.0215	0.0153
t _{1/2} (h)	20.75	35.19	t _{1/2} (h)	32.24	45.30
R ² (%)	98.9	90.1	R ² (%)	99.2	96.6

Homólogo C16-Ca			Homólogo C18:1-Ca		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0207	0.0118	k (h ⁻¹)	0.0225	0.0133
t _{1/2} (h)	33.49	58.74	t _{1/2} (h)	30.81	52.12
R ² (%)	95.3	97.2	R ² (%)	96.8	91.8

Homólogo C18-Ca			Jabón total		
	Sup.	10 cm		Sup.	10 cm
k (h ⁻¹)	0.0187	0.0105	k (h ⁻¹)	0.0253	0.0157
t _{1/2} (h)	37.07	66.01	t _{1/2} (h)	27.40	44.15
R ² (%)	93.1	91.8	R ² (%)	90.3	94.9

Tabla 8.27- Parámetros del ajuste a la ecuación exponencial de primer orden de todos los datos de campo para los homólogos C₁₂; C₁₄; C₁₆; C_{18:1}; C₁₈ y jabón total.

En las **Figuras 8.62 y 8.63**, se muestra el comportamiento del jabón y sus homólogos relacionando dos parámetros; la constante de degradación (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) con la longitud de la cadena de los distintos homólogos y con las 2 profundidades estudiadas.

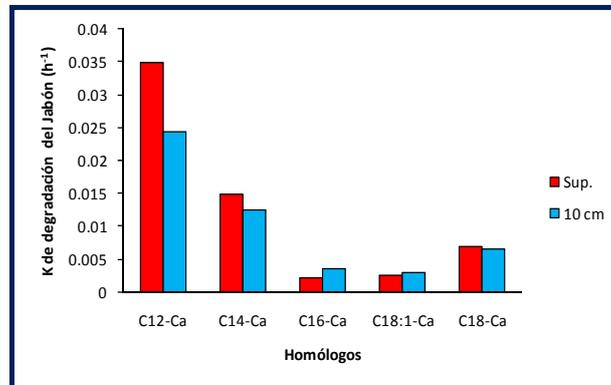


Figura 8.62- Relación entre la constante de degradación, la profundidad y la longitud de cadena.

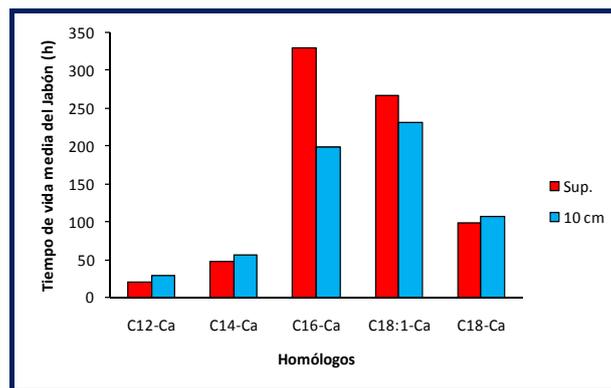


Figura 8.63- Relación entre el tiempo de vida media, la profundidad y la longitud de cadena.

4.2.3 - Estudio comparado de los resultados de campo

Analizando los datos de concentración de jabón en suelo a las distintas profundidades ensayadas, en todas las campañas estudiadas, se puede constatar:

1°.- Todos los homólogos estudiados en las condiciones experimentales descritas se adsorben, precipitan y biodegradan en los 10 primeros centímetros de la zona arable, no lixiviando a mayores profundidades, lo que indica un buen comportamiento desde el punto de vista medioambiental.

2°.- La degradación de los homólogos de jabón en suelo es relativamente rápida, con tiempos de vida media comprendidos entre 13,5 y 97,6 horas para la capa superficial y 15,5 y 173,3 horas para una profundidad de 10 cm. Los valores del tiempo de vida media para la degradación del jabón total están comprendidos entre 16.35 y 27.40 horas en la superficie (2 cm) y entre 19.47 y 44.15 horas en los 10 primeros centímetros. Los datos experimentales encontrados están representados en la **Figura 8.64**.

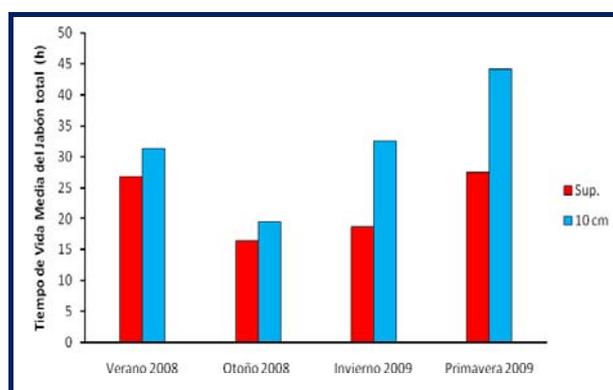


Figura 8.64- Tiempo de vida media para el jabón total a distintas profundidades y para cada campaña.

Estos resultados están en concordancia con otros resultados similares que fueron publicados para la degradación del tensioactivo LAS en cuatro suelos alemanes con cantidades bajas de materia orgánica (Küchler &

*Schnaak*⁷). Asimismo, *Larson*⁸ *et al.*, publicaron un tiempo de vida media para la degradación del LAS en distintos suelos que variaba desde 1 - 5 días. *Gejlsbjerg*⁹ *et al.*, divulgaron que el LAS biodisponible fue mineralizado a CO₂ con períodos de 7.9 días en el suelo. *Holt & Bernstein*¹⁰, relataron un tiempo de vida media para el LAS en suelo de aproximadamente 8 días, con una eliminación del analito del 94 - 99%.

3°.- 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 jabón total y sus homólogos, con las dos profundidades estudiadas, se constata, que la velocidad de degradación es mayor cuanto más cerca de la superficie se encuentran los analitos, de forma que $k_{2\text{cm}} > k_{10\text{cm}}$. Esta tendencia se cumple en todos los tratamientos realizados (**verano 2008, otoño 2008, invierno 2009 y primavera 2009**). A modo representativo, en la **Figura 8.65**, se muestran los valores del *ln* de la concentración de jabón total frente al tiempo a las distintas profundidades en el tratamiento de verano 2008.

⁷ Küchler T., Schnaak W. *Behaviour of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in sandy soils with low amounts of organic matter*. Chemosphere 35; 153-167, 1997

⁸ 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

⁹ Gejlsbjerg B., Klinge C., Madsen T. *Mineralization of organic contaminants in sludge-soil mixtures*. Environ. Toxicol. Chem. 20; 698-705, 2001

¹⁰ Holt M.S., Bernstein S.L. *Linear alkylbenzenes in sewage sludges and sludge-amended soils*. Water Res. 26; 613-624, 1992

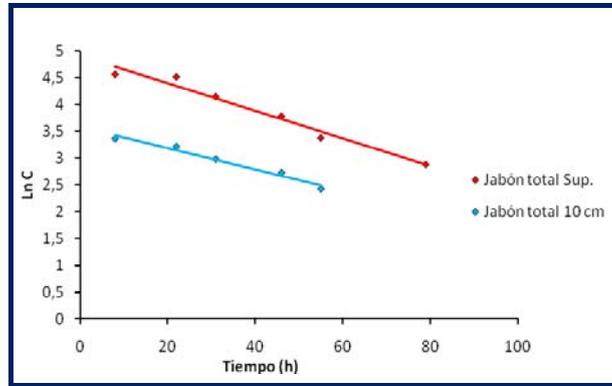


Figura 8.65- Degradación del jabón total durante el Verano 2008.

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 jabón se degrada más rápidamente en la capa superficial (mayor pendiente de las rectas).

Los mejores ajustes se obtuvieron en las campañas de **verano 2008** e **invierno 2009**. Los datos de ajuste de todas las campañas se muestran en la **Figura 8.66**. En ella se puede observar que en todas las experiencias el valor del coeficiente de determinación es superior 90%.

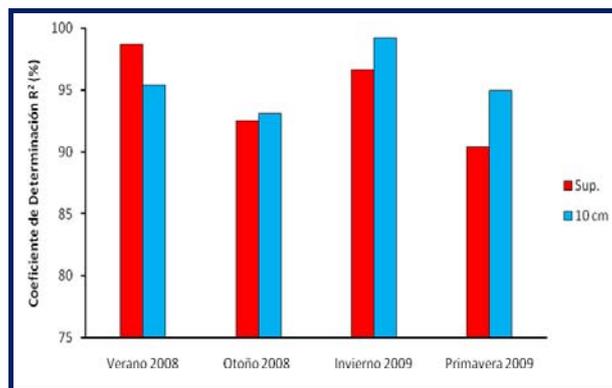


Figura 8.66- Ajuste de los datos de todas las campañas para el jabón total.

De acuerdo con *Beulke & Brown*¹¹, en un estudio realizado evaluando los parámetros de degradación de un pesticida en matrices 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*¹², *Beulke*¹³ *et al.*) 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*¹⁴ *et al.*)

4°.- Se observa asimismo y en concordancia con el postulado de *Swisher*¹⁵: “Principio de la distancia”, que conforme aumenta la longitud de la cadena alquílica, la constante de degradación (k) también aumenta, de modo que se puede apreciar que $k_{C_{12}} > k_{C_{14}} > k_{C_{16}} > k_{C_{18}}$, con la excepción del $C_{18:1}$ que debido de la presencia del doble enlace y, por tanto, a su mayor solubilidad en agua, presenta un comportamiento diferente al C_{18} , con constantes de degradación mayores, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de adsorción realizado en el laboratorio.

¹¹ Beulke S., Brown C.D. *Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling*. Biol. Fertil. Soils, 33; 558-564, 2001

¹² 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

¹³ 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

¹⁴ Zimdahl R., Cranmer B.K., Stroup W., *Use of empirical equations to describe dissipation of metribuzin and pendimethalin*. Weed Sci. 42; 241-248, 1994

¹⁵ Swisher R.D., *Surfactants biodegradation*, 2° Ed. Marcell Dekker, New York, USA, 1987

5°.- A la vista de los resultados obtenidos, se pudo comprobar que la velocidad de degradación varió en función de las estaciones estudiadas: Campaña de **otoño 2008** > **invierno 2009** > **verano 2008** \approx **primavera 2009**. A modo ilustrativo, en la **Figura 8.67**, se representan los datos de $\ln C$ del jabón total frente al tiempo a 2 cm de profundidad para cuatro diferentes estaciones.

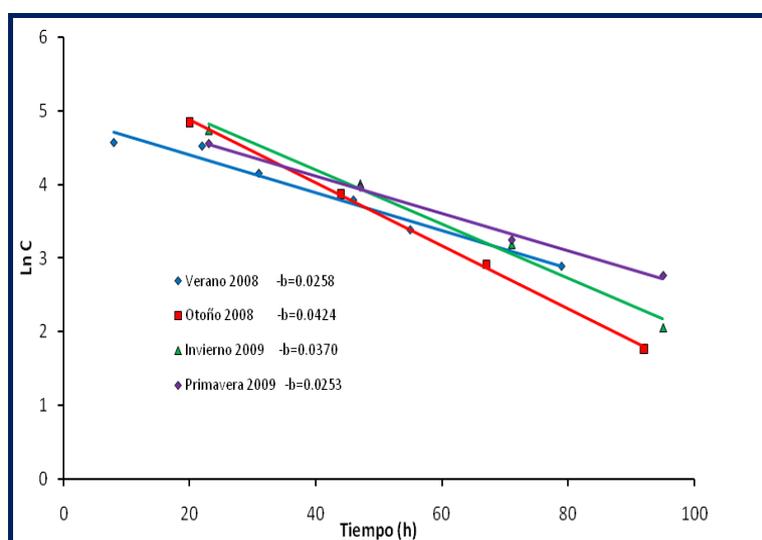


Figura 8.67- Degradación del jabón total en la zona superficial en las estaciones estudiadas.

En la siguiente figura (**Figura 8.68**), se representan los valores de k y $t_{1/2}$ encontrados para cada homólogo en las diferentes estaciones en función de la profundidad. En ella se observa una tendencia parecida a la descrita para el jabón total, salvo en el caso del $C_{18:1}$, que por las causas anteriormente mencionadas sigue un comportamiento distinto al resto.

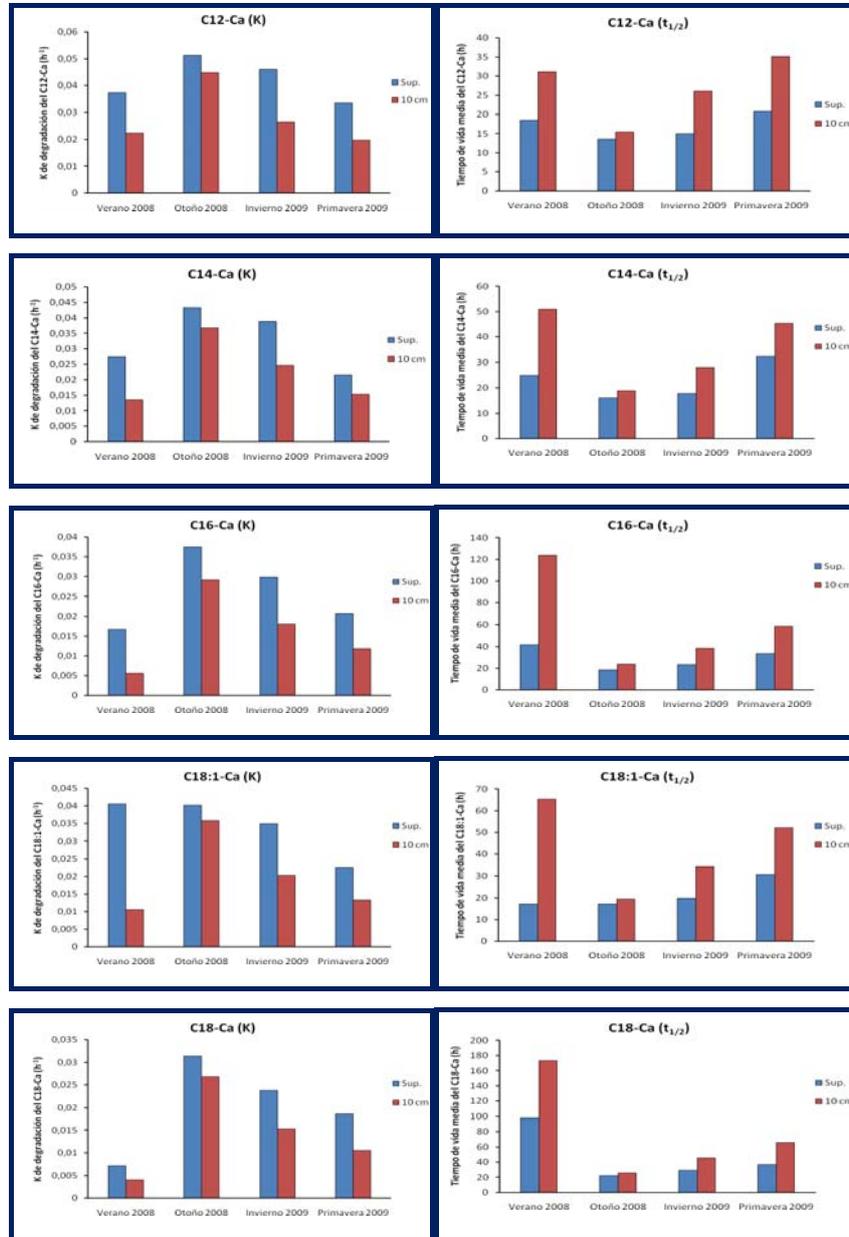


Figura 8.68- Valores de k y t_{1/2} obtenidos para los homólogos del jabón.

La diferencia encontrada entre estos parámetros según la estación considerada no puede atribuirse exclusivamente a la influencia directa de las variables climatológicas temperatura y la humedad, ya que un estudio riguroso exigiría conocer la influencia que estas ejercen sobre la microbiota que en definitiva es la responsable última de su biodegradación.



CONCLUSIONS



The research developed in this Thesis has led to obtain the following conclusions:

- ⇒ It has developed and validated analytical methods for the use of liquid chromatography with fluorescence detection for separation and determination of eight calcium salts of fatty acids (soap) in different environmental samples (soil, sewage sludge and sediments) and using different extraction techniques (Soxhlet, ultrasonic and microwave).

The proposed methods involve a first stage of sample treatment by extraction of interfering with petroleum ether. Then, the obtained dry residue is subjected to a conversion reaction (calcium soap to potassium soap). Third, it performs the extraction of obtained potassium soap. Subsequently, the extract undergoes a reduction in the preconcentrator. Next, it takes place a derivatization stage which uses BrMMC and Ether 18-Crown-6 as derivatives agents. Finally, studied compounds are separated and determined by liquid chromatography with fluorescence detection. Detection limits obtained by these methods, between 0.12 and 0.17 mg·Kg⁻¹, are low enough for the detection and the identification of these analytes in studied environmental matrices.

- ⇒ It has developed and validated analytical methods for the use of liquid chromatography with Diode Array detector for separation and determination of eight calcium salts of fatty acids (soap) in different environmental samples (soil, sewage sludge and

sediments) and using different extraction techniques (Soxhlet, ultrasonic and microwave).

The proposed methods involve a first stage of sample treatment by extraction of interfering with petroleum ether. Then, the obtained dry residue is subjected to a conversion reaction (calcium soap to potassium soap). Third, it performs the extraction of obtained potassium soap. Subsequently, the extract undergoes a reduction in the preconcentrator. Next, it takes place a derivatization stage which use DAP as derivative agent. Finally, studied compounds are separated and determined by liquid chromatography with Diode Array detector. Detection limits obtained by these methods, between 0.13 and 0.20 mg·Kg⁻¹, are low enough to for the detection and the identification of these analytes in studied environmental matrices.

⇒ It has developed and validated analytical methods for the use of liquid chromatography with fluorescence detection for separation and determination of different homologues (C₁₀-C₁₃) of linear alkylbenzene sulfonate in different environmental samples (soil, sewage sludge and sediments) and using different extraction techniques (Soxhlet, ultrasonic and microwave).

The proposed methods involve a first stage of sample treatment by extraction of the analytes in methanol. Subsequently, the extract undergoes a reduction in the preconcentrator. Finally, studied compounds are separated and determined by liquid chromatography with fluorescence detection. Detection limits obtained by these methods, between 3.30 and 5.40 µg·Kg⁻¹, are

low enough to use these methods for the detection and the identification of these compounds in studied environmental matrices.

- ⇒ It has conducted a statistical comparison between the proposed methods for the separation and determination of eight calcium salts (soap) in different samples (soils, sewage sludge and sediments).

The study was carried out through statistical comparison of slopes and intercepts of the calibration functions in sample, which were obtained during the establishment of the analytical methodology.

According to obtained results, it can be concluded that there is no difference between the slopes and intercepts obtained in each of studied samples, so a calibration function in a particular sample can be applied to other samples.

- ⇒ It has conducted a statistical comparison between the different extraction techniques (Soxhlet, ultrasonic and microwave) for the separation and determination of eight calcium salts (soap).

The study was carried out through statistical comparison of slopes and intercepts of the calibration functions in sample, which were obtained during the establishment of the analytical methodology.

According to obtained results, it can be concluded that there is no difference between the obtained slopes and intercepts in each of

studied extraction techniques, so a calibration function in sample obtained with a particular extraction technique can be applied to other studied techniques.

- ⇒ It has conducted a statistical comparison between the proposed methods for the separation and determination of different homologues (C₁₀-C₁₃) of linear alkylbenzene sulfonate in different samples (soils, sewage sludge and sediments).

The study was carried out through statistical comparison of slopes and intercepts of the calibration functions in sample, which were obtained during the establishment of the analytical methodology.

According to obtained results, it can be concluded that there is no difference between the obtained slopes and intercepts in each of studied samples, so a calibration function in a particular sample can be applied to other samples.

- ⇒ It has conducted a statistical comparison between the different extraction techniques (Soxhlet, ultrasonic and microwave) for the separation and determination of different homologues (C₁₀-C₁₃) of linear alkylbenzene sulfonate.

The study was carried out through statistical comparison of slopes and intercepts of the calibration functions in sample, which were obtained during the establishment of the analytical methodology.

According to obtained results, it can be concluded that there is no difference between the obtained slopes and intercepts in each of studied extraction techniques, so a calibration function in sample obtained with a particular extraction technique can be applied to other studied techniques.

- ⇒ It has conducted a statistical comparison between the proposed derivatization techniques (FLD y DAD) for the separation and determination of eight calcium salts (soap).

The study was carried out through statistical comparison of the obtaining results after analyzing, for each derivation technique, fifteen representative sewage sludge samples.

According to obtained results, it can be concluded that there is no difference between the results obtained by each derivatization reaction.

- ⇒ It has conducted a study of the obtained results after determining the amount of calcium salts of fatty acids (soap) and the amount of different homologues (C_{10} - C_{13}) of linear alkylbenzene sulfonate in different wastewater treatment plants (WWTP).

The study was carried out with the concentrations of *LAS* and soap and with known variables such as water hardness, number of inhabitants, treatment and, for some samples, seasonality.

According to obtained results, it can be concluded that:

- ✓ Soap concentrations are significantly greater than those found to *LAS*.
 - ✓ Both the concentration of the *LAS* as the soap are very influenced by the hardness of water, although, in the case of soap, there is a trend to find high concentrations in North-Central Spain, so it is hypothesized that temperature may be a factor to consider in the final results.
 - ✓ Unlike in the case of soap, there are significant differences in the concentrations of *LAS* between aerobic and one anaerobic sludge.
 - ✓ Similarly, disparate behaviour is detected in the presence of chemical stabilization; determine small concentrations for *LAS* and high concentrations for soap.
 - ✓ Finally, similar behaviour is observed for both surfactants to composting, the treatment chemical and study seasonal.
- ⇒ It has conducted a study of the obtained results after determining the amount of calcium salts of fatty acids (soap) and the amount of different homologues (C_{10} - C_{13}) of linear alkylbenzene sulfonate in marine sediments.

The study was carried out with the concentrations of *LAS* and soap and with known variables such as sampling, the sample frequency and location of the emissaries.

According to obtained results, it can be concluded that:

- ✓ Soap concentrations are significantly greater than those found to *LAS*. This phenomenon may occur, as in the case of sewage sludge sample, by the largest consumption the soap and its greater tendency to precipitate.
 - ✓ For both analytes, different concentrations between samples taken at the mouth of the emissary and those collect to the East, West and South is observed, containing these latest quantities of anionic surfactants substantially lower than those in the mouth.
 - ✓ In the same way and for both analytes, insignificant variability between the samples collected in the South, East and the West is detected.
 - ✓ In the case of *LAS*, it cannot be possible to find any relationship between concentration and seasonality. In contrast, higher concentrations are determined in the warmer seasons (spring and summer) for soap. However, the lack of data makes it impossible to generalize the observed behavior.
- ⇒ It has developed a new methodology for the study of the behaviour of soap on agricultural land, which includes the following phases: laboratory studies (in batch or continuous tank or column) and the seasonal field study.
- ⇒ As a preliminary step, it has been characterized the soil used in laboratory and field studies, and the water used in irrigation. Due to the influence of soil properties on adsorption and transport processes, it has determined their chemical characteristics (pH,

organic matter, cation exchange capacity, content of soluble anions and cations and total nitrogen) and their physical properties (texture, porosity, moisture and hydraulic conductivity). The results have allowed classifying the used soil as fluvisol calcareous soil.

⇒ In laboratory tests in batch (tank), it has established the kinetics and isotherms for adsorption / desorption of soap. So, it has proved the relative speeds with all homologues of soap are adsorbed, reaching the balance within 120 minutes. The process of desorption runs slightly slower, with an equilibrium time of 200 minutes. As well as the fact that the adsorption capacity increases with increasing alkyl chain length of the corresponding homologues. Moreover, neither the process of adsorption and desorption process are consistent with either set of simple models (Freundlich or Langmuir).

⇒ It is verified that both processes (adsorption and desorption) are not simple, but its kinetics and isotherms fit very well to a complex model consists of three reversible stages in equilibrium:

Adsorption / Desorption in the soils surface.

Adsorption / Desorption in the internal pores of the soil.

Precipitation of alkaline salts of soap.

It is reveals the existence of a hysteresis effect in the release of adsorbed, suggesting an appreciable adsorbent affinity for the adsorbed.

Test in continuous made in columns soil have confirmed the high affinity of soap on the studied soil, due to the formation of an impermeable film at the head of the column originated by the formation of calcium salts of soap. For this reason, it has only been possible to obtain the rupture curve of C₁₂ homologue. This fact is in total agreement with the proposed adsorption/desorption model.

⇒ We have studied the behaviour of soap in an experimental agricultural plot at, depending on climatic conditions at different seasons. This was carried out by surface application of analyte station and a number of irrigations in accordance with agricultural practices in the area. In all campaigns, the collection of soil was conducted at various depths (2.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0 cm). The time spent on each experience was the need for soap concentration reached a value close to the blank (residual amount of soap in the soil).

In the field tests (soil samples), it has proved that the analytes have low lixiviation capacity, being only retained in the first 10 centimeters. This result is in total agreement with the strong adsorption / precipitation of soap described in previous sections.

Analyzing soap concentration in soil at different depths, it is clear that the disappearance of soap in soil is relatively rapid with half-lives ranging between 13.50 and 97.60 hours for the surface layer and 15.50 and 173.30 hours for a depth of 10 cm. The values of the half-life for degradation of total soap are between 16.35 and 27.40 hours on the surface (2 cm) and between 19.47 and 44.15

hours in the first 10 centimeters. These times are consistent with studies by other authors about of, in this case, the *LAS*, indicating a rapid biodegradation in two weeks.

In all cases, degradation curves fit a first-order kinetic. If we compare the constants of degradation (k) for the total soap and their homologues with depths, it appears that the degradation rate is higher the closer to the surface are the analytes, so that $k_{2\text{cm}} > k_{10\text{cm}}$. This trend is observed in all studied seasons.

It is observed that as increases the length of alkyl, the constant of (k) degradation also increases, so it can see that $k_{C_{12}} > k_{C_{14}} > k_{C_{16}} > k_{C_{18}}$. This observation is similar for all seasons. These results are consistent with the postulate of *Swisher*: "Distance principle". In the case of the $C_{18:1}$, it is detected different behaviour from the rest, due to derived properties from the presence of the double bond, giving it a greater solubility and, therefore, a superior constant degradation attributable to a greater availability.

Degradation rate for total soap varies depending on studied stations, so that the autumn 2008 > winter 2009 > summer 2008 \approx spring 2009.



SUMMARY



The presented Thesis entitled “Determination of anionic surfactants in environmental matrices: study of soap behaviour in an agricultural plot“can be summarized in several parts:

➤ **Subject of the Thesis**

The growing concern of the European Union in the regulation of surfactants, together with the shortage of relevant environmental information of soap, due to lack of analytical methodologies able to determine soap in different environmental matrices, and its undoubted economic importance, justify themselves, the environmental study of soap. Similarly, and in spite of the existence of numerous publications of the environmental performance of the *LAS*, the interest in the *LAS* study lies in the novel conclusions that can be derived from its study and monitoring, together with soap, in different environmental matrices.

For the study field, a soil from la Vega de Granada has been selected, which has great relevance in agriculture. Due to its irrigation, with urban water and, therefore, with little or no wastewater industrial pollution, the selected plot gathers ideal conditions for carrying out the proposed research. In addition, the study area presents a climatic variety during all seasons, which makes it especially useful to the time to draw conclusions.

This study aims, on the one hand, improve the existing methodology for the detection and determination of surfactants and, on the other hand, deeper understanding of the different

mechanisms (adsorption, precipitation, mobility, photodegradation, biotransformation aerobic, anaerobic biotransformation ...) that can contribute to facilitate or hinder the bioavailability of these products on the plot.

Comparison of the results obtained in the laboratory with the field tests, make it possible to perform the corresponding interrelations and to establish different mechanisms to justify its real behavior in the area.

➤ **Development of analytical methodologies to determine soap in environmental matrices**

Several methodologies to analyzed soap are proposed in this Thesis. Development of theses methodologies comprises:

- *Optimization of sample treatment:* In order to obtain an workable methodologies, several matrices such as soils sewage, sludge and marine sediments are studied. In the same way, three different extraction techniques (Soxhlet, ultrasound and microwave assisted extraction (MAE)) are also used. Therefore, three different extraction procedures for each environmental matrix are presented in this Thesis.

First, in the case of soap, to remove possible compounds able to be derived in the same conditions as soap, a preliminary extraction is required. In order to select a properly extraction solvent, several solvents such as petroleum ether, hexane or methanol are tested for each extraction technique and for each

environmental matrix. In addition, variables such as extraction time, volume of extraction solvent, and in some cases temperature are optimized, using, in most, experimental designs to obtain the optimum.

The second part of sample treatment, after removing compounds able to interfere in the derivatization reaction, is convert calcium soap in potassium soap. Most of soap is presented as a precipitated salt (mainly calcium salt) in environment. This salt is nearly impossible to solve in common organic or inorganic solvent, so to analyze calcium soap, a conversion reaction is required. Unlike calcium soap, potassium soap is easily solved in common solvents such methanol and water. In the presented Thesis, the variables related to conversion of calcium soap to potassium soap (water volume, quantity of reactivities, reaction time, etc) are optimized for each studied matrix (soils, sewage sludge and marine sediments).

The third part involves an another extraction procedure to extract the potassium soap generated in the previous step. Similar to ether petroleum extraction step, several solvents such as petroleum ether, water or methanol are tested for each extraction technique and for each environmental matrix. In addition, variables such as extraction time, volume of extraction solvent, and in some cases temperature are optimized, using, in most, experimental designs to obtain the optimum.

The last part of sample treatment is the preconcentration step. In order to obtain suitable limit of detection and quantification, a

preconcentration step, before derivatization, is proposed. Depending on the detection techniques used (fluorescence detection or ultraviolet detection) and to obtain similar limits of detection and quantification, two different preconcentration steps are developed.

- *Derivatization reaction:* Similar to fatty acid, it is necessary a derivatization reaction to determine soap at low concentrations in the environment. In the presented Thesis, two new derivation reactions are developed to analyze potassium soap by liquid chromatography. One reaction for fluorescence detection, using BrMMC and crown ether as reactivities, and another for ultraviolet detection, using DAP as reactive. Variables related to derivatization reaction such as quantity of reactivities and analytes, reaction time, volume, temperature, etc., are optimized following experimental designs.
- *Chromatographic separation by liquid chromatography:* In order to determine the different homologues of studied soap (eight), a chromatographic separation is required. Taking into account the physical and chemical properties of soap, a reverse-phase chromatographic separation is presented. Variables related to reverse-phase chromatographic separation such as quantity column type, composition of mobile phase, pH, organic modifiers, injection volume, vial composition, etc. are studied and optimized. It is noteworthy to mention that the same chromatographic separation, developed and optimized, is used for both derivatization reactions (fluorescence and ultraviolet).

This fact is explained by the structural similarity of the reactives (DAP and BRMMC) used in this Thesis.

➤ **Development of analytical methodologies to determine LAS in environmental matrices**

Several methodologies to analyze LAS are proposed in this Thesis. Development of these methodologies comprises:

- Optimization of sample treatment: Similar to soap determination and in order to obtain workable methodologies, several matrices such as soils, sewage sludge and marine sediments are studied. In the same way, three different extraction techniques (Soxhlet, ultrasound and microwave assisted extraction (MAE)) are also used. Therefore, three different extraction procedures for each environmental matrix are presented in this Thesis.

The first part involves an extraction procedure to extract the LAS (precipitated and adsorbed) in environmental soil samples. Several solvents such as petroleum ether, water or methanol are tested for each extraction technique and for each environmental matrix. In addition, variables such as extraction time, volume of extraction solvent, and in some cases temperature, are optimized, using, in most, experimental designs to obtain the optimum.

Finally, in order to obtain suitable limit of detection and quantification, a preconcentration step is proposed. Solid Phase extraction (SPE) and preconcentration step based on evaporation

and redissolution are compared. Unlike most of analytical papers published, in this case SPE is not required.

- Chromatographic separation by liquid chromatography: In order to determine the different homologues of studied *LAS* (four), a chromatographic separation is required. Taking into account the physical and chemical properties of *LAS*, a reverse-phase chromatographic separation is presented. Variables related to reverse-phase chromatographic separation such as quantity column type, composition of mobile phase, pH, organic modifiers, injection volume, vial composition, etc. are studied and optimized. In the case of *LAS*, a derivatization reaction is unnecessary, since *LAS* have native fluorescence.
- **Validation of proposed methodologies. Comparison between different extraction techniques and between different environmental matrices**
- Validation procedure: Both surfactants (soap and *LAS*) are presented in high concentration in environment, so it is very difficult to find a representative sample free of analytes (only possible in soil). Therefore, a validation procedure based on spiking of analytes at low concentrations cannot be used. Taking into account this evidence, to solve this analytical problem, two standards for each surfactant different from analytes are selected to perform the analytical validation. These compounds have physical and chemical properties similar to soap and *LAS* and are not present in environmental samples, so results obtained for these standards can easily be extrapolated to soap and *LAS*. Based

on this approach and in order to evaluate matrix effect and recovery percentage, three calibration function are calculated (standard calibration function, matrix calibration function and standard addition calibration function). It is noteworthy to mention that this validation procedure is carried out for each environmental matrix and for each extraction technique. According to results, a matrix effect, which is related to the extraction procedure, is detected in all cases. In addition, recoveries higher than 90 percent are estimated in all cases.

- *Comparison study:* For each analyte (soap and LAS), statistical comparisons between different environmental samples and between different extraction techniques is carried out. Results show insignificant differences between matrixes and between samples treatment, so a matrix calibration function calculated in one matrix can be used to quantify the rest of matrices. According to this, for each analyte, analytical parameters for all methodologies such as limit of detection and quantification are calculated using the matrix calibration function obtained in soils samples.

Taking into account the insignificant differences between sample treatments and numerous collected samples, one extraction technique should be selected to analyze the samples. Due to its easy extraction procedure and its capacity of analyzing several samples at once, MAE is by far the better extraction technique. Therefore, MAE is used to determine the concentration of soap and LAS in all collected samples.

In addition, a comparison between different derivatization reactions to soap analysis is performed. Results show insignificant differences between fluorescence detection and ultraviolet detection.

➤ **Monitoring study of *LAS* and soap in sewage sludge samples**

More than forty samples located throughout Spain are analyzed in the presented study. In addition and in order to complete the monitoring study, variables related to WWTP such as water hardness, habitants and WWTP treatment are also studied.

To analyze results and to obtain properly conclusions, an statistical study of results is carried out. According to the statistical study, the concentration of *LAS* is highly dependent on water hardness. This water hardness dependency is also observed in soap. In soap case, apart from water hardness, there are probably other variables such as temperature that can have effect on concentration soap.

➤ **Monitoring study of *LAS* and soap in marine sediments from Almeria coast**

Nearly fifty samples (for *LAS*, only fifteen in soap, due to tack of sample) located in Almeria coast are analyzed in the presented study. In addition and in order to complete the monitoring study, variables such as type of emissary, sampling frequency and location of the sample points are also studied.

To analyze results and to obtain properly conclusions, an statistical study of results is carried out. According to the statistical study, the concentration of *LAS* is highly dependent on the location of the sample points and the sampling frequency. Unlike soap concentration only depends on the sampling frequency.

Finally, fifteen soils samples collected in different points throughout La Huerta de la Vega are analyzed. These analyses are only carried out for soap. According to results, the soap concentration in the samples is very low, in some cases below detection limit.

➤ **Field study in agricultural plot from La Vega de Granada**

Field study is carried out after laboratory study. In lab, sorption and desorption kinetics are calculated in batch conditions with soils samples. According to results, soap homologues sorption is very quick. However desorption process is too slow, probably due to the possible formation of calcium soap (high concentration of calcium salts in soils samples) and its subsequent insolubility in water. In addition, a column study with soil samples is performed. Results show a strong tendency to precipitate in column assay, being impossible to determine the rupture curves.

After studying soap behaviour in lab, a seasonal lixiviation / degradation study of soap is carried out. In order to estimate the soap behaviour in an experimental agricultural plot located in Huerta de la Vega (Granada), a commercial distribution of soap is

seasonally applied by flood. After application, samples are collected at different depths for several weeks.

Taking into account results, under these conditions, soap is biodegraded in few days. Regarding lixiviation, soap is only detected in the first 10 cm.

