



Universidad de Granada

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

**COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE
TENSIOACTIVOS COMERCIALES
ANIÓNICOS Y NO IÓNICOS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
FRANCISCO RÍOS RUIZ**

SEPTIEMBRE 2010



Universidad de Granada

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**

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

Trabajo Fin de Máster:

**COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE
TENSIOACTIVOS COMERCIALES ANIÓNICOS Y NO
IÓNICOS**

Realizado por:

FRANCISCO RÍOS RUIZ

Dirigido por:

Doctora MERCEDES FERNÁNDEZ SERRANO

Doctora MANUELA LECHUGA VILLENA

del Departamento de Ingeniería Química

Granada, Septiembre 2010

COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE TENSIOACTIVOS COMERCIALES ANIÓNICOS Y NO IÓNICOS

Memoria que presenta el Ingeniero Químico Francisco Ríos Ruiz como Trabajo Final del Máster en Ciencia y Tecnología de Coloides e Interfases.

Granada, Septiembre 2010.

Fdo. Francisco Ríos Ruiz

LOS TUTORES DEL TRABAJO

Fdo. Mercedes Fernández Serrano

Profesora Titular de Ingeniería Química

Fdo. Manuela Lechuga Villena

Profesora Contratada Doctora

ÍNDICE

RESUMEN-----	1
I. OBJETIVOS -----	5
II.- INTRODUCCIÓN-----	11
2.1. TENSIOACTIVOS-----	13
2.2 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS TENSIOACTIVOS-----	15
2.3 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE TENSIOACTIVOS-----	20
2.4 IMPLICACIONES AMBIENTALES -----	22
2.4.1 INTRODUCCIÓN -----	22
2.4.2 NORMATIVA SOBRE TENSIOACTIVOS Y MEDIO AMBIENTE -----	24
2.4.2.1. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO EUROPEO -----	24
2.4.2.2. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO ESTATAL -----	27
2.4.2.3. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA ----	28
2.4.3 BIODEGRADABILIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO-----	29
2.4.3.1 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD -----	29
2.4.3.1.1. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN-----	29
2.4.3.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN -	36
2.4.3.2 VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN -----	39
2.4.3.3 RUTAS DE BIODEGRADACIÓN-----	43
2.4.4. TOXICIDAD-----	44
2.4.4.1 INTRODUCCIÓN -----	44
2.4.4.2 MECANISMOS DE TOXICIDAD EN ORGANISMOS ACUÁTICOS -----	45
2.4.4.3. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y TOXICIDAD-----	46
III.- MATERIALES Y MÉTODOS -----	51
3.1 TENSIOACTIVOS UTILIZADOS -----	53

3.2 MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD	56
3.2.1 ENSAYO ESTÁTICO.....	56
3.2.1.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO	56
3.2.1.2. ReACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	57
3.2.1.3. EQUIPOS.....	59
3.2.1.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	59
3.2.1.5. PROCEDIMIENTO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN	60
3.2.1.6. SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN.....	62
3.2.2 ENSAYO POR EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO.....	62
3.2.2.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO	62
3.2.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	63
3.2.2.3. EQUIPOS.....	64
3.2.2.4. PROCEDIMIENTO.....	65
3.2.2.5. TOMA DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	65
3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS	67
3.3.1 ANÁLISIS DE TENSIOACTIVOS	67
3.3.1.1 MÉTODO SIMPLIFICADO DE ANÁLISIS PARA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO (MBAS).....	67
3.3.1.2 MÉTODO COLORIMÉTRICO DEL YODO-YODURO.....	68
3.3.1.3. MÉTODO DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC)	70
3.3.2 RECUENTO DE LA BIOMASA.....	75
3.3.2.1. FUNDAMENTO.....	75
3.3.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	75
3.3.2.3. EQUIPOS.....	76
3.3.2.4. PROCEDIMIENTO.....	76
3.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD	77
3.4.1 ENSAYO TOXICIDAD LUMIS _{tox}	77
3.4.1.1. FUNDAMENTO.....	77

3.4.1.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES-----	77
3.4.1.3. EQUIPOS-----	77
3.4.1.4 PROCEDIMIENTO-----	78
3.4.1.5. EVALUACIÓN -----	79
3.4.1.6. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC -----	81
3.4.2 ECOTOXICIDAD <i>DAPHNIA MAGNA</i> -----	81
3.4.2.1. FUNDAMENTO-----	81
3.4.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES-----	81
3.4.2.3. EQUIPOS-----	82
3.4.2.4. PROCEDIMIENTO-----	82
3.4.2.5. EVALUACIÓN -----	83
3.4.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE IC-----	84
3.4.3 ECOTOXICIDAD MICROALGAS -----	85
3.4.3.1. FUNDAMENTO-----	85
3.4.3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES-----	85
3.4.3.3. EQUIPOS-----	86
3.4.3.4. PROCEDIMIENTO-----	87
3.4.3.5 EVALUACIÓN -----	89
3.4.3.6. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC -----	90
3.5 PROTOCOLO DE LIMPIEZA-----	91
3.5.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL CORRIENTE DE LABORATORIO -----	91
IV.- RESULTADOS EXPERIMENTALES -----	93
4.1 BIODEGRADABILIDAD DE TENSIOACTIVOS-----	95
4.1.1 BIODEGRADABILIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS -----	95
4.1.2 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS (APG)-----	100
4.1.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS (AEG) -----	103
4.1.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL (LAS) -----	105
4.2 TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS-----	106

4.2.1 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS -----	106
4.2.2 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS-----	114
4.2.3 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS -----	118
4.2.4 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA -----	122
4.2.5 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS -----	125
4.2.6 TOXICIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL (LAS)-----	126
V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	129
5.1 BIODEGRADABILIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS -----	131
5.1.1 BIODEGRADABILIDAD ÚLTIMA -----	132
5.1.2 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN-----	136
5.1.3 BIODEGRADACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO -----	140
5.1.4 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LOS PERFILES DE BIODEGRADACIÓN -----	142
5.2 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS-----	145
5.2.1 BIODEGRADACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO-----	146
5.2.2 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LOS PERFILES DE BIODEGRADACIÓN -----	150
5.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS -----	153
5.3.1 BIODEGRADABILIDAD PRIMARIA -----	154
5.3.2 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN-----	157
5.3.3 CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN-----	159
5.3.4 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO -----	163
5.4 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL -----	165
5.5 TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS-----	167
5.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE IC ₅₀ , EC ₂₀ y EC ₅₀ -----	169
5.5.2 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS -----	170
5.5.2.1 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES-----	171
5.5.2.2 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> -	173
5.5.2.3 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON MICROALGAS-----	176

5.5.3 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS-----	181
5.5.3.1 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES -----	182
5.5.3.2 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> -----	183
5.5.3.3 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON MICROALGAS -----	185
5.5.4 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS -----	188
5.5.4.1 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES ---	189
5.5.4.2 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> -----	190
5.5.4.3 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON MICROALGAS-----	192
5.5.5 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA -----	196
5.5.5.1 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON BACTERIAS LUMINISCENTES -----	197
5.5.5.2 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> -----	199
5.5.5.3 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON MICROALGAS -----	200
5.5.6 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS -----	204
5.5.6.1 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS CON <i>DAPHNIA MAGNA</i> -----	204
5.5.7 TOXICIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL -----	206
5.5.8 RESUMEN DE DATOS DE TOXICIDAD-----	207
VII.- CONCLUSIONES -----	213
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	221
ÍNDICE DE TABLAS -----	232
ÍNDICE DE FIGURAS -----	238

RESUMEN

El medio acuático está constituido por una amplia diversidad de ecosistemas. Cada uno de estos sistemas contiene una biota característica representada por miles de especies que con excesiva frecuencia están expuestas a gran variedad de contaminantes derivados, generalmente, de la actividad humana. Más allá de los detergentes, cuya aplicación es la más común, los tensioactivos poseen numerosas aplicaciones dadas sus propiedades emulsionantes, humectantes, dispersantes, así como de solubilidad y resistencia a la dureza del agua. Su elevado y creciente consumo ha hecho de estas sustancias uno de los contaminantes más frecuentes en el medio acuático. Al objeto de evaluar los posibles riesgos ambientales de estos compuestos para decidir sobre su inclusión o no en las formulaciones de detergentes, resulta imprescindible el conocimiento de su distribución, comportamiento, destino y efectos tóxicos en el medio natural.

El presente Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo fundamental el estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de diferentes familias de tensioactivos (aniónicos y noiónicos) en el medio acuático.

En el Capítulo II se lleva a cabo una revisión general de los aspectos fundamentales tratados en este trabajo. En primer lugar se resumen las características físico-químicas más importantes de los tensioactivos así como sus principales efectos adversos en el medio ambiente y la normativa vigente al respecto. Los aspectos más relevantes relacionados con el estudio de la biodegradabilidad y toxicidad de los tensioactivos en el medio acuático son también presentados en este capítulo.

El Capítulo III se describen los tipos de tensioactivos estudiados y sus principales propiedades, así como la metodología utilizada durante el desarrollo del trabajo experimental. Se han realizado dos tipos de ensayos: ensayos de biodegradación (estático y respirométrico), y de toxicidad sobre diferentes organismos, bacterias luminiscentes, *Daphnia magna* y microalgas *Selenastrum capricornutum*. Para el seguimiento de la biodegradación y análisis de tensioactivos se emplearon diferentes métodos: método simplificado de análisis para determinación de sustancias activas al azul de metileno (MBAS), método colorimétrico del yodo-yoduro, método del carbono orgánico total (TOC) y recuento de biomasa expresado como unidades formadoras de colonias.

En el Capítulo IV se exponen los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de biodegradación y ecotoxicidad de los diferentes tensioactivos estudiados.

En el Capítulo V se realiza el análisis y discusión de los resultados obtenidos para los tensioactivos no iónicos comerciales: alquilpoliglucósidos (APG), alcoholes grasos etoxilados (AGE), óxidos de amina, ésteres de glicerina polietoxilados, y tensioactivos aniónicos comerciales: derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, además del tensioactivo aniónico lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), ampliamente utilizado en formulaciones comerciales, con objeto de comparación.

Este análisis permitirá decidir sobre la inclusión de un determinado tensioactivo en una formulación específica atendiendo a criterios medioambientales.

Obtenidos los perfiles de biodegradación para los tensioactivos ácidos alquiletercarboxílicos, alcoholes grasos etoxilados, y LAS, se han definido parámetros característicos del proceso de biodegradación: tiempo de latencia, biodegradabilidad, tiempo de vida media, velocidad media de biodegradación y concentración residual de tensioactivo. Estos parámetros se modifican con la concentración de tensioactivo ensayada, indicando que a medida que aumenta la concentración de tensioactivo se produce una disminución de la velocidad del proceso de biodegradación, un aumento del tiempo de vida media, una disminución de la biodegradabilidad y un aumento de la concentración residual de tensioactivo.

A partir de las curvas de crecimiento de microorganismos, se han definido y evaluado parámetros característicos durante el proceso de biodegradación para alcoholes grasos etoxilados: la velocidad específica de crecimiento (k), el número máximo de unidades formadoras de colonias ($\text{UFC}/\text{ml}_{\text{max}}$) y el rendimiento de producción de biomasa por gramo de tensioactivo tratado (Y_{ap}).

La biodegradación de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y alquilpoliglucósidos también ha sido realizada aplicando el método respirométrico evaluando la DBO. El estudio de los perfiles de biodegradación ha permitido la evaluación de la biodegradabilidad última de estos tensioactivos determinando el tiempo de latencia, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la mineralización alcanzada.

Con determinación de la velocidad específica de crecimiento obtenida (μ), evaluada por el método respirométrico se ha determinado que: el tensioactivo AKYPO RLM-100 de mayor grado de etoxilación puede considerarse como fácilmente biodegradable, el AKYPO

RLM-25 se considera de biodegradabilidad inherente para concentraciones superiores a 5 mg/L y fácilmente biodegradable a concentraciones inferiores, el tensioactivo AKYPO LF2 se considera de biodegradabilidad inherente y que los tres alquilpoliglucósidos ensayados GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 y GLUCOPON 650, pueden considerarse de biodegradabilidad inherente.

A partir de los resultados de toxicidad obtenidos se observa que las microalgas son el organismo menos sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos con un rango de EC_{50} entre 7.08 y 1112.93 mg/L, mientras que las bacterias son las más sensibles, EC_{50} entre 0.354 y 211.05 mg/L. La *Daphnia magna* presenta una sensibilidad intermedia para la mayoría de los casos, IC_{50} entre 3.48 y 383.44 mg/L. También se observa que la toxicidad es función de la estructura química, los valores de toxicidad son mayores para los tensioactivos de mayor longitud de cadena carbonada y de menor grado de etoxilación, y que está relacionada con la concentración micelar crítica, de modo que disminuye al aumentar dicho parámetro.

De los tensioactivos ensayados el más tóxico es el AKYPO RLM-25, y los menos tóxicos son el AKYPO LF6 y GLUCOPON 215. El resto de tensioactivos presenta toxicidades intermedias, que dependen del organismo de ensayo utilizado. Para los ácidos alquiletercarboxílicos el más tóxico es el AKYPO RLM-25, con un valor de IC_{50} para *Daphnia magna* de 3.48 mg/L, para los alquilpoliglucósidos es el GLUCOPON 600, IC_{50} de 22.42 mg/L, para los óxidos de amina el OXIDET DM-4, IC_{50} de 15.46 mg/L, y para los ésteres de glicerina polietoxilados el LEVENOL C-421, IC_{50} de 42.77. Para el LAS se obtuvo un valor de IC_{50} con *Daphnia magna* de 10.09 mg/L.

De los resultados obtenidos y análisis realizado se obtienen una serie de conclusiones generales recogidas en el Capítulo VI.

I. OBJETIVOS

Los agentes químicos más empleados en la industria para la limpieza son fundamentalmente: ácidos y bases fuertes que originan problemas de corrosión en las instalaciones y máquinas de lavado siendo altamente irritantes, tensioactivos aniónicos como alquilbensulfonatos, no iónicos como los alquilfenol etoxilados y tensioactivos catiónicos como los trialquilbenzilamonio halogenados, que son incompatibles con los tensioactivos aniónicos y llevan cloro en su composición que puede originar problemas de toxicidad y biodegradabilidad cuando llegan a las aguas residuales etc.

Las formulaciones tensioactivas también contienen secuestrantes como trifosfatos y nitrilotriacético que originan problemas de eutrofización y secuestran metales pesados que no son fácilmente eliminados en las estaciones depuradoras de aguas residuales y pueden pasar a la cadena alimentaria.

La mayoría de estos productos consiguen la limpieza y desinfección o saneamiento de las instalaciones reduciendo el número total de microorganismos y destruyendo los gérmenes patógenos pero en algunos casos precisan altas temperaturas y tiempos de contacto elevados.

El efecto de los detergentes industriales utilizados en procesos de lavado sobre las aguas residuales es lógicamente bastante intenso si se tiene en cuenta la cantidad vertida y la frecuencia con que se vierte. Las últimas tendencias que van imponiendo las empresas multinacionales, consisten en la fabricación de detergentes que actúen a pHs neutros, a menor temperatura, con enzimas, que sean fácilmente biodegradables y de baja toxicidad. Las ventajas son importantes: tanto para la máquina como los materiales que se lavan que sufren un menor desgaste, y los problemas de precipitación de cal y magnesio se disminuyen e incluso se anulan. Además, en esas condiciones, es posible añadir un mayor número de aditivos que mejoran la detergencia, pudiéndose conseguir fórmulas cada vez más eficaces y sofisticadas.

Los detergentes son introducidos en las aguas naturales en grandes cantidades, tanto procedentes de la industria como de las aguas domésticas; y esta contaminación lleva consigo la formación de espumas que ocasiona, además del impacto estético, una perturbación en el intercambio de oxígeno entre el agua y la atmósfera, lo que retrasa su biodegradación tanto natural, como en las estaciones depuradoras de aguas. Además ejercen un papel emulsionante o solubilizante sobre aceites y grasas y se dificulta también su eliminación.

La Unión Europea concede a los productos detergentes que demuestren cumplir requisitos de biodegradabilidad, ecotoxicidad, uso ventajoso de envases, sistemas de lavado, etc., la denominada Etiqueta Ecológica Comunitaria, como distintivo de producto verdaderamente ecológico (Reglamento CE 1980/2000 de 17 de Julio de 2000, relativo a un sistema comunitario revisado de concesión de etiqueta ecológica). La tendencia, por tanto, es utilizar cada vez en mayor medida tensioactivos eficaces pero menos dañinos con el medio ambiente, ya que constituyen, por volumen, uno de los principales compuestos xenobióticos presentes en las aguas residuales urbanas. Esto nos lleva a la necesidad de establecer la ecotoxicidad de estos productos mediante ensayos que permitan evaluar su comportamiento ambiental, elaborando fichas técnicas de las últimas familias de tensioactivos que han salido al mercado, para decidir sobre su inclusión o no en las formulaciones de detergentes.

Esta preocupación por la conservación del medio ambiente ha aumentado considerablemente en los últimos años. Una de las consecuencias más directas consiste en la implantación de nuevas restricciones para el uso de determinados compuestos así como reglamentaciones que limiten sus vertidos. La Comisión Europea (2003), basándose en el Reglamento Nº 1488/94 y las Directivas 93/67/EEC y 98/8/EC, elaboró una guía técnica para la evaluación de los posibles riesgos generados por la presencia de compuestos químicos en los diferentes compartimentos ambientales.

La evaluación de riesgo ambiental comprende el estudio del destino final de un determinado compuesto tras ser vertido al medio así como de los posibles efectos adversos sobre los organismos pertenecientes a los diferentes compartimentos ambientales receptores.

Al objeto de evaluar el destino final de un determinado compuesto resulta necesario el conocimiento de los múltiples procesos y transformaciones fisicoquímicas y biológicas a los que se puede ver sometido. La biodegradación constituye uno de los procesos degradativos más importantes, desempeñando un papel fundamental en la eliminación de compuestos en el medio receptor. Debido a que se ve influenciada por un gran número de factores ambientales, el estudio de la biodegradabilidad de un compuesto en un determinado compartimento ambiental supone una ardua tarea que no es posible abordar en un solo trabajo experimental. Se requiere el análisis de los resultados de múltiples trabajos realizados bajo diferentes condiciones que se puedan dar en el medio de estudio.

El estudio de la toxicidad constituye otro de los factores clave en la evaluación del riesgo ambiental pues nos permite establecer la concentración umbral de un determinado

compuesto por encima de la cual se pueden producir efectos adversos en la biota y, en consecuencia, garantizar la integridad del ecosistema. A partir de las concentraciones de efectos calculadas para diferentes organismos (EC_{50} , IC_{50} , etc.) se puede establecer un valor pronóstico de concentración ambiental que no produciría ningún efecto sobre la comunidad biológica.

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

Los objetivos concretos marcados han sido:

- El estudio de la biodegradabilidad de tensioactivos aplicando los métodos oficiales: ensayo estático (UNE 55-844-91), y método respirométrico (OECD, 1993).
- El análisis del crecimiento de microorganismos durante el proceso de biodegradación determinando las unidades formadoras de colonias en función del tiempo de biodegradación.
- El efecto que sobre la biodegradación tiene la modificación de la concentración de tensioactivo y la influencia de la estructura del tensioactivo ensayado.
- El estudio de la toxicidad de los distintos tensioactivos conforme a diferentes métodos de ensayo:
 - Norma UNE-EN ISO 11348-2, con el sistema de medición LUMISTox suministrado por Dr. LANGE basado en la inhibición de la intensidad luminosa de la bacteria marina de la cepa *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177.
 - Norma UNE-EN ISO 6341:1996, basado en el recuento de microcrustáceos *Daphnia magna* inmovilizados, tras la exposición durante 24 horas con el tóxico, mediante el Kit DAPHTOXKIT F™.
 - Norma UNE-EN ISO 28692:1994, basado en la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce, *Selenastrum capricornutum*, tras la exposición durante 72 horas con el tóxico, mediante el Kit ALGALTOXKIT F™,
- Análisis de la influencia de la estructura del tensioactivo sobre la toxicidad.

II.- INTRODUCCIÓN

2.1. TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos, también conocidos como agentes de superficie, constituyen un amplio grupo de compuestos químicos con un gran número de aplicaciones debido a sus propiedades de solubilidad, detergencia, resistencia a la dureza del agua, así como emulsionantes, dispersantes y humectantes. Estos compuestos, de naturaleza anfifílica, constan de dos partes estructurales o grupos bien diferenciados, un grupo hidrofílico (Grupo cabeza) y una cadena hidrocarbonada (Cola hidrofóbica).

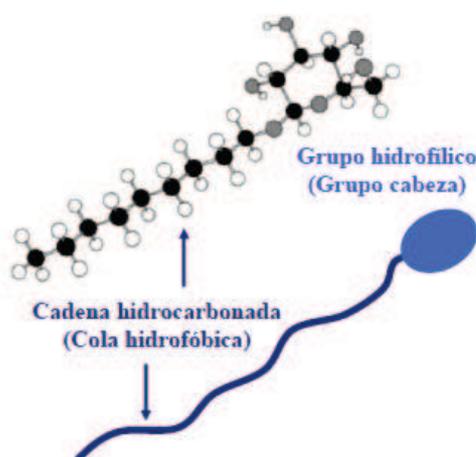


Figura II. 1.- Estructura básica de un tensioactivo

La presencia de ambos grupos en su molécula le confieren diversas propiedades tales como la capacidad para disminuir la tensión superficial del agua, la formación de monocapas de esparcimiento ó de absorción en la interfase agua/aire, la formación de emulsiones y/ó microemulsiones, la formación de micelas, etc.

En función del carácter iónico del grupo hidrófilo, los tensioactivos se dividen en cuatro grandes familias:

- **Tensioactivos aniónicos:** poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga negativa y responsables de la actividad superficial. Contienen comúnmente grupos solubles, sulfatos y sulfonatos de sodio. Son los más utilizados en formulaciones detergentes en polvo para lavado de ropa y en productos líquidos para uso en lavavajillas.

- **Tensioactivos catiónicos:** poseen grupos funcionales que se ionizan en disolución acuosa originando iones orgánicos con carga positiva y responsables de la actividad superficial. Son principalmente compuestos cuaternarios de amonio. Presentan la ventaja de que son compatibles con los tensioactivos no iónicos y anfotéricos y la desventaja de ser incompatibles con los tensioactivos aniónicos. Asimismo su capacidad detergente y su biodegradabilidad es baja y su coste económico es más elevado que el de los tensioactivos aniónicos y no iónicos. Se suelen usar como agentes emulsionantes a pH inferiores a 7, además presentan propiedades suavizantes y desinfectantes.
- **Tensioactivos no iónicos:** En disolución acuosa no originan iones. Poseen grupos funcionales con elevada afinidad por el agua, lo que los hace solubles en ésta. Algunos son productos de condensación del óxido de etileno con materiales fenólicos o grasos. Son compatibles con todos los tipos de tensioactivos. Constituyen un grupo de tensioactivos de amplia y variada aplicación. En general presentan bajo poder espumante y suelen ser productos líquidos o pastosos.
- **Tensioactivos anfotéricos:** poseen grupos funcionales que pueden ionizarse en disolución acuosa confiriendo al compuesto el carácter de aniónico o catiónico, según las condiciones del medio. No se utilizan mucho como materias primas para detergentes. Algunos proporcionan una excelente espumación y bajo nivel de irritabilidad cutánea y ocular, por lo que resultan muy apropiados en las formulaciones de champú. Son compatibles con todos los tipos de tensioactivos.

En la Tabla II.1 se muestran los principales tipos de tensioactivos utilizados así como sus acrónimos (Sibila, 2008a).

Tabla II.1 Principales tipos de tensioactivos utilizados (Sibila, 2008a)

Clase	Nombre Común	Acrónimo
Tensioactivos aniónicos	Lineal alquilbenceno sulfonatos	LAS
	Alcanos sulfonatos secundarios	SAS
	Alcoholes éter sulfatos (alquil etoxisulfatos)	AES
	Alcoholes sulfatos (alquil sulfatos)	AS
Tensioactivos No-iónicos	Alquilfenoles etoxilados	APE ó APEO
	Nonilfenoles etoxilados	NPE ó NPEO
	Octilfenoles etoxilados	OPE ó OPEO
	Alcoholes etoxilados	AE ó AEO
Tensioactivos catiónicos	Sales de amonio cuaternario	QAC
	Haluros de alquil trimetil amonio	TMAC
	Haluros de alquil dimetil amonio	DMAC
	Haluros de alquil bencil dimetil amonio	BDMAC
	Haluros de dialquil dimetil amonio	DADMAC
	Cloruro de bi(alquil grasa hidrogenada) dimetil amonio	DTDMAC
	Cloruro de dietil éster dimetil amonio	DEEDMAC

Desde un punto de vista comercial, los tensioactivos más utilizados han sido los lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS), alquil etoxisulfatos (AES), alquil sulfatos (AS), alquilfenoles etoxilados (APE), alcoholes etoxilados (AE), y las sales de amonio cuaternario (QAC). Desde un punto de vista científico, los lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS), alquil etoxisulfatos (AES) y las sales de amonio cuaternario (QAC) constituyen los tensioactivos más estudiados (Ying, 2006).

2.2 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son compuestos anfifílicos (en su estructura molecular poseen un grupo afín al disolvente y otro no), pero no todos los compuestos anfifílicos se pueden considerar tensioactivos, así, el alcohol etílico es un compuesto anfifílico, pero no es un tensioactivo. Para que un compuesto anfifílico pueda ser considerado tensioactivo es necesario que posea una longitud de cadena hidrófoba de ocho o más átomos de carbono (hidrofobicidad mínima) y que presente una polaridad mínima (relación hidrófila/hidrófoba adecuada) dependiendo de las características del grupo o grupos polares presentes. Por otro lado estos compuestos anfifílicos deben presentar la posibilidad de formar agregados micelares para ser considerados compuestos tensioactivos.

Las propiedades fisicoquímicas de las disoluciones de tensioactivos y las propiedades relacionadas con los fenómenos de asociaciones moleculares se muestran en la Figura II.2

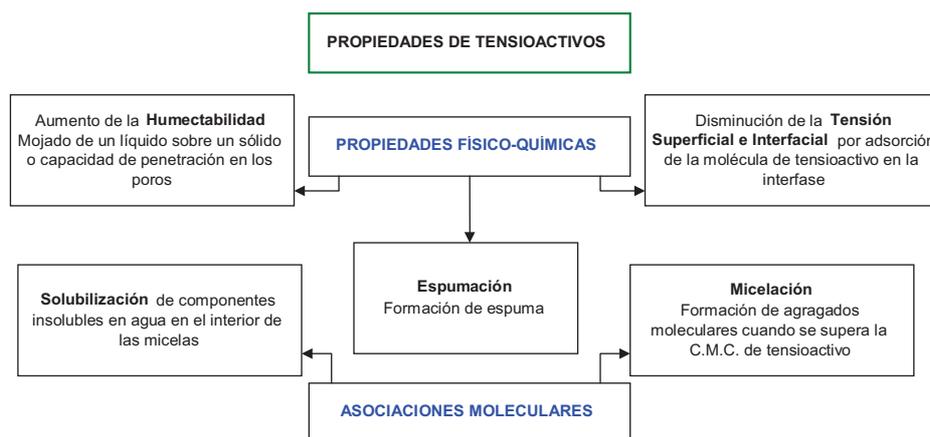


Figura II. 2.- Propiedades de los tensioactivos

Las propiedades de adsorción en superficies y de asociación molecular determinan fenómenos relacionados con la aplicación de los agentes tensioactivos como son:

- *Formación de espuma*: la disminución de la tensión superficial entre un líquido y el aire hace que la superficie del líquido pueda deformarse con extrema facilidad y provocar la inclusión de multitud de burbujas de aire (Hedreul, 2001).

- *Formación de emulsiones, microemulsiones y liposomas*: cuando dos líquidos inmiscibles entre sí se encuentran en presencia de tensioactivos, uno de ellos, por efecto de la disminución drástica de la tensión interfacial, puede dividirse, mediante acción mecánica, en partículas de pequeño tamaño (del orden de algunas micras). Este sistema de dos fases dividido en pequeñas gotitas (fase dispersa) inmersas en otra fase (fase continua) se denomina emulsión. Se reconoce por su aspecto lechoso o de crema. Es termodinámicamente inestable y con el tiempo termina separándose en sus dos fases originales (proceso de coalescencia). Cuando la fase dispersa está formada por una fase apolar y la continua es polar se dice que la emulsión es aceite en agua (O/W), y a la inversa, cuando la fase dispersa son gotitas de agua o una sustancia polar, se denomina emulsión agua en aceite (W/O).

Si la tensión interfacial es muy baja, pueden conseguirse sistemas dispersos en que el tamaño de las gotas es inferior a una micra. En este caso, el sistema es estable termodinámicamente y se denomina microemulsión. Su aspecto es translúcido o totalmente transparente y de viscosidad normalmente elevada. Las emulsiones y microemulsiones son de gran aplicación en cosmética, farmacia, tecnología de los alimentos, etc.

Los liposomas son estructuras complejas huecas, similares a una estructura celular, formadas artificialmente mediante un sistema agua, aceite y tensioactivo (intervienen

sustancias como el colesterol, la fosfatidilcolina y la lecitina). Se caracterizan por poder transportar en su interior principios activos, y sobre todo por su capacidad de penetrar intactos a través de membranas biológicas y posteriormente liberar, una vez producida la penetración, ese principio activo. (Kunieda, 1998; Solans, 2001; Forgiarini, 2002).

- *Solubilización*: si la cantidad de tensioactivo es suficientemente elevada, pueden llegarse a solubilizar de forma completa sustancias normalmente inmiscibles entre sí. En el tránsito, pueden darse no sólo disoluciones verdaderas sino que pueden formarse estructuras complejas tipo coloide o gel. En perfumería, esta propiedad es fundamental para hacer que los perfumes (aceites) puedan estabilizarse en multitud de productos comerciales que deben estar perfumados (cosméticos, detergentes, plásticos y otros objetos en general).

- *Detergencia*: los tensioactivos pueden hacer que partículas de suciedad dejen de adherirse a las superficies que “ensucian”, gracias a la modificación del equilibrio de tensiones interfaciales del sistema formado por el sustrato, la suciedad y el baño de lavado (donde está disuelto el tensioactivo). Por esta razón, los tensioactivos son el componente principal de los detergentes.

- *Transferencia de oxígeno y otros gases*: otro de los efectos más interesantes de los tensioactivos es la modificación de la transferencia de oxígeno, y cualquier gas en general, a través de membranas. Dos son los sistemas que hay que destacar como muy importantes: El primero es el caso de los pulmones, ya que la transferencia de oxígeno sólo es posible por la presencia de los denominados tensioactivos pulmonares. El otro caso es el de las agallas de los peces: cuando el medio acuoso en que viven se contamina con ligeras cantidades de tensioactivos, los peces terminan muriendo. Esta es una de las razones por las que es imprescindible que los tensioactivos sean suficientemente biodegradables para que no alcancen los ríos, lagos y mares, (Sandbacka, 2000).

Ciertas propiedades, tales como la tensión superficial, la tensión interfacial, la presión osmótica, la conductividad equivalente o la detergencia, presentan curvas especiales frente a la concentración de tensioactivo en disolución.

En todos los casos hay una zona, más o menos estrecha de concentración en que la curva toma una forma singular (un mínimo, un máximo o un cambio brusco). Esta concentración se denomina concentración micelar crítica (CMC) y se asocia a la formación de unas estructuras, normalmente globulares, denominadas micelas.

En la Figura II.3 se muestra un ejemplo de dichas curvas para el dodecil sulfato de sodio.

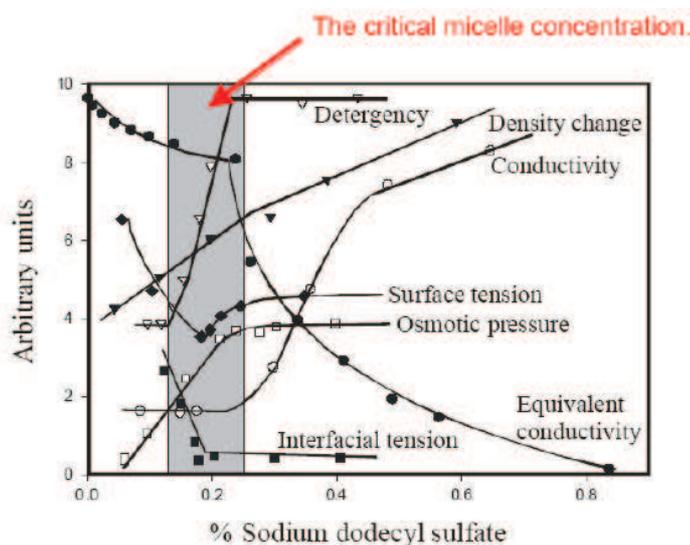


Figura II.3.- Modificación de las propiedades en función de la concentración de tensioactivo.

Las propiedades anteriormente señaladas les confieren a los productos tensioactivos una gran versatilidad y se utilizan en multitud de aplicaciones: productos farmacéuticos, formulaciones detergentes, operaciones con metales, flotación, alimentación, etc.

En la Tabla II.2 se muestran los diferentes campos de aplicación en diversas industrias y los tensioactivos más utilizados en ellas (Ortega, 2009).

Tabla II. 2.- Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (Ortega, 2009)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOSACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
ALIMENTARIA	Acilglicerolos	Emulsionantes
	Esteres de sorbitano	Humectantes
	Copolímeros de óxido de etileno-propileno, Alquilsulfatos, Esteres de poliglicol	Antiespumantes
		Limpieza de instalaciones
CURTIDOS	Nonilfenoles polietoxilados	Humectación/penetración
	Alcoholes grasos polietoxilados	Desengrase
	Monoésteres de ácidos grasos sulfatados	Curtición
	Alquilsulfatos	Tintura
	Alquilnaftalensulfonatos, Lignin-sulfonatos, Aceites saturados	Engrase
	Pastas de pigmento	
PINTURAS, LACAS Y TINTES	Condensados de naftalensulfonato y formaldehído	Dispersión de pigmentos
	Alquilsulfato, Dialquilsulfosuccinato sódico, Alcoholes grasos polietoxilados, Aminas polietoxiladas	Modificadores de fluidez
		Emulsionantes de resinas

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
AGRICULTURA	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados, Esteres fosfatados, Poliglicoles, Aceites sulfatados	Emulsificación de plaguicidas y herbicidas
		Humectación y dispersión
		Emulsiones oleosas
COSMÉTICA	Esteres de poliglicol Óxidos de amina Alcoholes grasos polietoxilados Alquilpoliéter sulfatos, Alcanolamidas, Alquilbetainas, Dialquilsulfosuccinatos	Emulsiones de cremas cosméticas
		Champúes, geles
		Jabones de tocador
		Solubilizantes de perfumes
		Emulsionantes para aceites esenciales
DETERGENTES	Alquilbenceno sulfonatos Olefin-sifonatos Parafin-sulfonatos Sulfatos de alcoholes grasos polietoxilados Alquil polieter sulfatos Oxidos de amina, Alquilfenoles polietoxilados, Alcanolamidas, Sulfonatos de ácidos grasos, Sales de amonio cuaternario	Detergentes en polvo
		Detergentes líquidos
		Estabilizadores de espuma
		Productos limpieza de superficies duras
		Sanitarios
		Productos lavavajillas
		Limpiadores textiles
PAPELERA	Esteres de poliglicoles Alcoholes grasos polietoxilados Polipropilen-glicoles, Aminas polietoxiladas, Nonilfenoles polietoxilados	Agentes humectantes de la pulpa
		Eliminación de espuma de la pulpa
		Emulsionantes de ceras
		Reutilización del papel
PETRÓLEO Y DERIVADOS	Alquilpoliéter sulfatos Lign-sulfonatos Alcanolamidas Imidazolinás, Poliglicoles, Ésteres sulfonados, Alquilbenceno sulfonatos	Solubilizantes del agua e inhibidores de corrosión
		Ruptura de emulsiones
		Dispersantes
		Recuperación del petróleo
		Eliminación de mareas negras
PLÁSTICOS Y GOMAS	Alquilbenceno sulfonatos Alcoholes grasos polietoxilados Alquilsulfatos Copolímeros óxido de etileno-propileno Amidas polietoxiladas, Dialquilsulfosuccinato sódico, Sales de amonio cuaternario	Emulsionantes para la producción de emulsiones de polímeros
		Agentes antielectrostáticos
		Modificadores de viscosidad
		Controladores del olor
		Polimerización en emulsión
TEXTILES	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados Sales de amonio cuaternario Aceites naturales polietoxilados, Alcoholes frasos polietoxilados, Esteres de poliglicol, Esteres sulfonados, Sulfonatos de petróleo	Detergentes y auxiliares de humectación
		Agentes antielectrostáticos
		Suavizantes y lubricantes
		Aceites autoemulsionables
		Jabones para limpieza en seco

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

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

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

La Tabla II.3 muestra composiciones orientativas de algunos ejemplos de formulaciones detergentes.

Tabla II. 3.- Composición de algunos detergentes (Bailón, 2003)

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

2.3 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE TENSIOACTIVOS

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

En Europa se estimó una producción total de tensioactivos de 2.48 millones de toneladas para el año 2000, de los cuales un 49.6% corresponde a no iónicos, un 40.2% a tensioactivos aniónicos, un 8.3% a catiónicos y un 1.8 % a la producción de anfóteros

(Umsicht, 2003). En 2007, la producción supero los 3 millones de toneladas únicamente en Europa Occidental (CESIO, 2008).

Considerando la producción total de tensioactivos, alrededor del 60% corresponde a tensioactivos utilizados en detergentes domésticos, mientras que un 30% es empleado en aplicaciones técnicas e industriales, un 7% en limpieza industrial y 6% en productos de higiene corporal (Edser, 2006). En la Figura II.4 se representa el consumo total de tensioactivos para el año 2006 en las principales regiones del mundo.

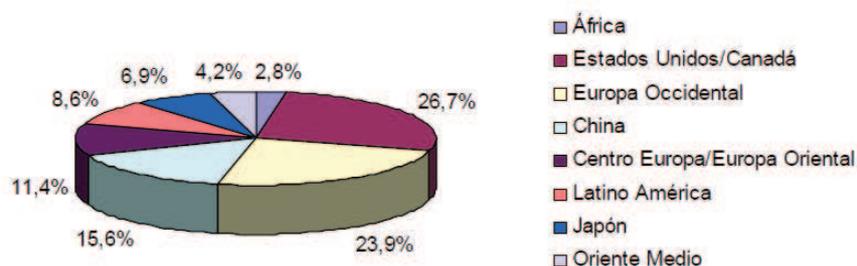


Figura II.4.- Consumo mundial de tensioactivos durante el año 2006 (Janshekar y col.,2006).

En las Figuras II.5A y II.5B se representan la evolución del consumo de tensioactivos (excluidos los jabones) en España, durante los años 1996-2006. Existe un claro un aumento del consumo total de tensioactivos durante los últimos años, pasando de un valor de 240 a 388 millones de kilogramos, lo que supone un aumento total del 61% (INE, 2006). Asimismo, se observa un consumo fluctuante para los tensioactivos aniónicos, sin apenas incremento en valores absolutos durante la última década (Fig. II.5B). Para el resto de tensioactivos el consumo aumenta claramente, siendo más acusado en el caso de los tensioactivos catiónicos, superando ligeramente el consumo de aniónicos a partir del año 2002 (INE, 2006).

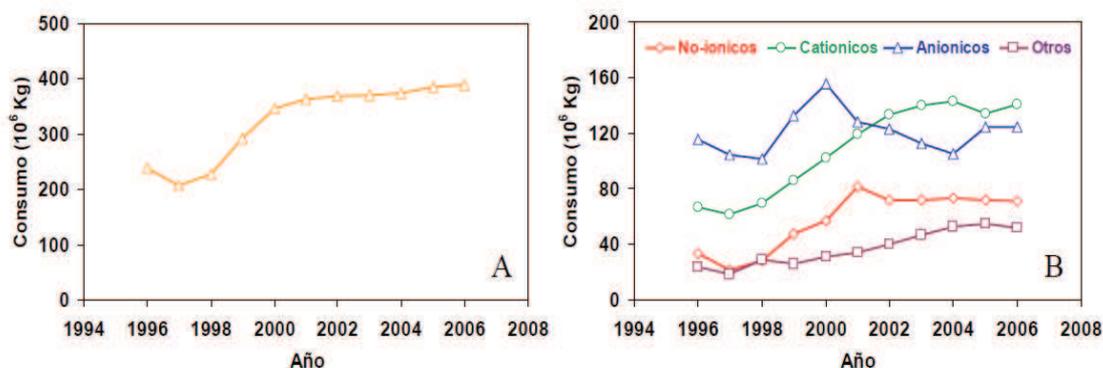


Figura II.5. Evolución del consumo de tensioactivos en España durante los años 1996-2006. (A) consumo total de tensioactivo, (B) consumo de tensioactivos por tipo (INE, 2006).

2.4 IMPLICACIONES AMBIENTALES

2.4.1 INTRODUCCIÓN

A pesar del gran número de aplicaciones y de las numerosas ventajas que presentan los tensioactivos tanto en el ámbito industrial como económico y sanitario, desde un punto de vista ambiental, éstos son considerados como un importante contaminante del medio acuático. Una vez utilizados, estos compuestos llegan a las estaciones depuradoras a través de las aguas residuales urbanas e industriales y en determinados casos son vertidos directamente a las aguas superficiales. Durante el tratamiento de las aguas residuales, un elevado porcentaje de estos compuestos es eliminado mediante procesos de biodegradación y adsorción en el material particulado, mientras que los metabolitos generados son dispersados en los diferentes compartimentos ambientales (Ying, 2006). En la figura II.6 se observan las posibles vías de emisión de detergentes al medio ambiente.

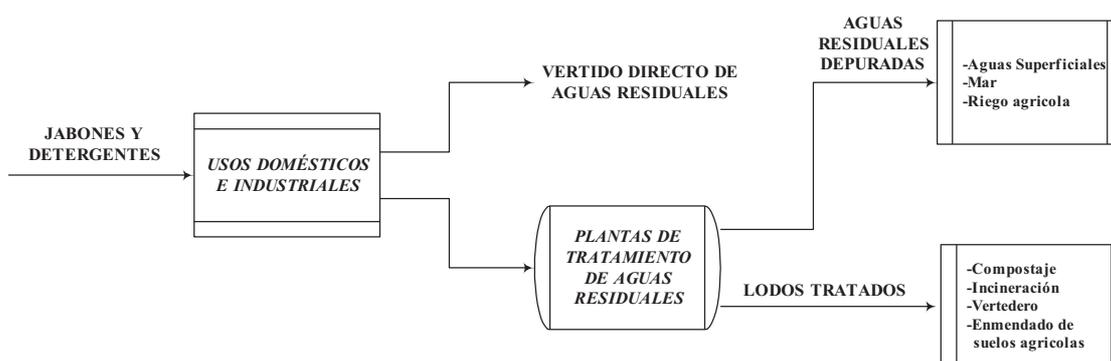


Figura II.6.- Vías de emisión de detergentes al medio ambiente

Los principales efectos atribuibles a los tensioactivos como consecuencia de su presencia en el medio acuático son:

1. Aumento del pH de las aguas residuales a valores superiores a 12.
2. Problemas de eutrofización en cauces receptores debido a los altos niveles de fósforo procedentes del tripolifosfato, principal secuestrante de las formulaciones detergentes.
3. La sustitución de los fosfatos por otros secuestrantes como el NTA o el EDTA no evita el problema de la eutrofización y además existe un problema añadido: los iones pesados como plomo o mercurio pueden ser solubilizados entrando a formar parte del ciclo del agua, de forma que al ser ingeridos son tóxicos (llegan a ocasionar problemas mutagénicos).

4. Puede aumentar la presencia de niveles elevados de cloro y de compuestos organoclorados de naturaleza muy dudosa; algunos posiblemente de carácter tóxico y/o carcinógeno.
5. 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.
6. Algunos de los compuestos de la formulación presentan efectos tóxicos, tanto sobre los microorganismos como sobre los organismos superiores que allí habitan.
7. Efecto sobre la coagulación y sedimentación en plantas de depuración.
8. Contaminación de aguas subterráneas, aunque no es muy frecuente y siempre como síntoma de otra contaminación más importante.
9. Producción de espuma tanto en los ríos como en las plantas de depuración de aguas residuales.

Las concentraciones de tensioactivos en aguas superficiales pueden predecirse a partir de los estudios realizados en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs), según los datos analíticos obtenidos para las aguas depuradas y teniendo en cuenta un factor de dilución. Estos valores de concentración predichos serían solo una aproximación, ya que aguas abajo, los ríos poseen cierta capacidad para seguir degradando o eliminando compuestos tensioactivos vertidos en él.

En la Tabla II.4 se muestran datos promedio para concentraciones de tensioactivos aniónicos expresados como MBAS (sustancias activas al azul de metileno) y no iónicos expresados como BiAS (sustancias activas al yoduro de bismuto), para la entrada y salida de una EDAR de tipo biológico, así como las concentraciones promedio predecibles en los ríos a que se vierte el agua depurada, considerando un factor de dilución de 12, en puntos próximos al de vertido de dichas aguas.

Tabla II. 4.- Concentraciones medias de tensioactivos aniónicos (MBAS) y de tensioactivos no iónicos (BiAS) en EDARs y en aguas de río

TENSIOACTIVOS	ENTRADA EDAR, mg/L	SALIDA EDAR, mg/L	RÍO, mg/L
Aniónicos, (MBAS)	4-20	0.08-0.40	0.006-0.032
No iónicos, (BiAS)	2-6	0.10-0.30	0.008-0.025

Se observa que los valores de concentración para ambos tensioactivos en las aguas depuradas, son de un orden muy bajo, y por supuesto en los ríos son aún menores, llegando a ser en algunos casos inferiores al límite de sensibilidad del método analítico correspondiente.

En determinadas aguas superficiales pueden llegar a detectarse concentraciones de tensioactivos superiores a los indicados en la Tabla II.4 como consecuencia de que el factor de dilución sea menor que el valor considerado de 12, o bien porque en ciertos tramos del río se realicen vertidos sin depurar o incontrolados.

Cabe destacar que durante el proceso de canalización de las aguas residuales domésticas a través de los colectores y en el trayecto hasta la propia entrada de las EDARs, tiene lugar una importante eliminación de los tensioactivos por efecto de adsorciones en sólidos en suspensión y en las propias conducciones, e incluso, por procesos de hidrólisis o degradación.

En general, las concentraciones de detergentes en aguas residuales pueden oscilar entre 1-20 mg/L, y en aguas superficiales en torno a 0.5 mg/L. El sabor en agua se detecta a partir de 0.2 mg/L, y la formación de espumas a partir de 0.3 mg/L, concentraciones en agua de 2.5 mg/L afectan al crecimiento de plantas y de 5-6 mg/L son tóxicas para algas y peces en general (Martín, 1995).

2.4.2 NORMATIVA SOBRE TENSIOACTIVOS Y MEDIO AMBIENTE

El creciente consumo de tensioactivos así como sus posibles repercusiones ambientales constituyen las principales razones por las que diferentes instituciones y organismos públicos hayan promulgado normas para el control y uso de estas sustancias.

2.4.2.1. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO EUROPEO

La primera legislación fue establecida en Alemania en 1961, donde se exigía que la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos fuese del 80%. Posteriormente surgieron directivas relativas a la biodegradabilidad de tensioactivos utilizados en las formulaciones de detergentes:

– Directiva (73/404/CEE), donde se establecía que:

“Los Estados miembros prohibirán la comercialización y el empleo de los detergentes cuando la biodegradabilidad media de los tensioactivos que contengan sea inferior al 90 %, en cada una de las categorías siguientes: aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfólitos. El empleo

de tensioactivos cuyo índice medio de biodegradabilidad sea, por lo menos, igual al 90 % no deberá perjudicar, en condiciones normales de uso, la salud del hombre o de los animales". (CEE, 1973a).

→ Directiva 73/405/CEE, donde se examinan los procedimientos por los que la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos contenidos en los detergentes puede ser determinada. (CEE, 1973b).

Estas directivas se pusieron al día con las Directivas del consejo 82/242/CEE y 82/243/CEE, (CEE, 1982 a y b).

Finalmente en 2004 el Parlamento europeo establece el **"Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes"** (Reglamento CE nº648, 2004), que deroga las Directivas 73/404/CEE, 73/405/CEE, 82/242/CEE, 82/243/CEE y 86/94/CEE y la Recomendación 89/542 de la Comisión relativa al etiquetado de detergentes, y con el que se pretende armonizar de manera uniforme y simultánea la normativa de todos los Estados miembros y simplificar sus futuras adaptaciones

Con este reglamento se persigue una mayor protección del medio ambiente incluyendo una legislación más restrictiva, pues incluye todos los tipos de tensioactivos e impone para los detergentes unos métodos de ensayo más estrictos sobre la biodegradabilidad final, y no ya sobre la inicial.

Se pretende también una protección de los consumidores, que quedan más protegidos contra las sustancias perfumantes y los agentes conservantes que están presentes en los detergentes y pueden provocar alergias. Se introduce un etiquetaje específico para informar a los consumidores sobre la presencia de este tipo de sustancias en los detergentes. El Reglamento hace obligatorias las prescripciones de la Recomendación 89/542 de la Comisión sobre el etiquetado de estas sustancias alergénicas, incorporándolas en la nueva legislación.

El reglamento incluye regulaciones sobre el etiquetado exigiendo que los fabricantes deban hacer que figure en la etiqueta la lista de todos los ingredientes, enumerados por orden decreciente de concentración, así como la dirección de un sitio Internet donde el consumidor pueda consultar la lista completa de ingredientes.

Además, el Reglamento añade un método de control suplementario para los agentes de superficie poco solubles en agua (modificación del anexo III).

Al Reglamento CE nº 648/2004, posteriormente se le han aplicado tres actos modificativos:

- Reglamento (CE) nº 1336/2008
- Reglamento (CE) nº 219/2009
- Reglamento (CE) nº 551/2009

y cuatro modificaciones de los Anexos:

- Reglamento (CE) nº 907/2006. Modificación del Anexo III: Métodos de ensayo de biodegradabilidad.
- Reglamento (CE) nº 551/2009. Modificación del Anexo V – Lista de tensioactivos objeto de excepción.
- Reglamento (CE) nº 551/2009. Modificación del Anexo VI – Lista de tensioactivos de detergentes prohibidos o limitados.
- Reglamento (CE) nº 907/2006. Modificación del Anexo VII – Etiquetado y hoja informativa de ingredientes.

De forma resumida el reglamento establece que:

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

Por otra parte, en el ámbito de la Unión Europea la política de prevención y control de los productos químicos está coordinada mediante el **“Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas”** (Reglamento nº 1272, 2008), posteriormente modificado por el Reglamento (CE) Nº 790/2009 de la comisión de 10 de Agosto de 2009, (Reglamento nº 790, 2009).

Con este Reglamento se pretende armonizar los requisitos sobre clasificación, etiquetado y envasado de las sustancias químicas y sus mezclas conforme al sistema internacional aprobado por las Naciones Unidas, con el fin de la protección de la salud y seguridad de la población y del medio ambiente, así como mejorar la libre circulación de sustancias químicas y sus mezclas.

2.4.2.2. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO ESTATAL

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

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

La concentración límite admisible para el contenido de tensioactivos en aguas superficiales continentales empleadas en la obtención de agua potable para el consumo público, está entre 0.2 y 0.5 mg/L, según el tipo de tratamiento a que se someta (BOE, 1988). Para aguas ya tratadas que se destinan a consumo público, la reglamentación establece una concentración límite de tensioactivos aniónicos de 0.2 mg/L (BOE, 1990).

La legislación española sobre etiquetado de sustancias y preparados peligrosos proviene en su mayor parte de una adopción de las disposiciones comunitarias. La referente al etiquetado en transporte, sin embargo, es reflejo de convenios internacionales.

La elaboración de la normativa sobre sustancias y preparados químicos es competencia del Ministerio de Sanidad y Consumo, en coordinación con los Ministerios de Medio Ambiente, Industria y Energía, Trabajo y Asuntos Sociales y Agricultura, Pesca y Alimentación.

El Real Decreto 2816/1983, de 13 de octubre, aprobó la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de los detergentes. Teniendo en cuenta, que los productos en ella regulados han sufrido, en los últimos años, importantes innovaciones, técnicas y comerciales y, además, la entrada en vigor del Real Decreto 1078/1993, de 2 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos, y la aprobación del Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas (BOE, 1995), se hizo necesario llevar a cabo una actualización de la Reglamentación técnico-sanitaria.

Se consideró oportuno extender el ámbito de aplicación de la Reglamentación técnico-sanitaria hacia otros productos cuya fabricación, comercialización y aplicaciones son similares a los detergentes. Asimismo, se establecieron requisitos especiales de formulación y etiquetado para ciertos lavavajillas líquidos con el fin de mejorar su seguridad. Finalmente mediante el Real Decreto 770/1999, de 7 de mayo, se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes y limpiadores (BOE, 1999).

2.4.2.3. LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA

En la Comunidad Autónoma Andaluza el Decreto 14/1996, de 16 de Enero, aprobó el reglamento de calidad de las aguas litorales (BOJA, 1996). Tras definir el marco normativo de actuación para preservar y mejorar la calidad de las aguas litorales en la Ley de Protección Ambiental de la comunidad andaluza, se establecen los límites de vertido y los métodos de análisis correspondientes. En el Anexo I del Reglamento se establece que no podrán autorizarse vertidos al dominio público marítimo-terrestre cuya carga contaminante en detergentes supere los límites siguientes: 5 mg/L (media mensual); 20 mg/L (media diaria) y 50 mg/L (valor puntual). Como método de análisis para detergentes se especifica la espectrofotometría de absorción molecular con un límite de detección de 0.001 mg/L. Se trata por tanto de una legislación general que no distingue entre los distintos tipos de tensioactivos y que únicamente contempla un método de análisis de biodegradabilidad primaria y no final.

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

2.4.3 BIODEGRADABILIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO

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

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

2.4.3.1 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD

2.4.3.1.1. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN

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

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

Durante los años 1968-1970 un grupo de expertos de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) trabajó en un procedimiento de ensayo que pudiese ser adoptado internacionalmente. El procedimiento fue publicado en 1971 (OECD, 1971) y consistía en dos métodos de ensayo:

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

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

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

desaparición de un tensioactivo aniónico “duro” del tipo tetrapropilénbenceno sulfonato debe ser al menos del 35 % durante el tiempo de duración del ensayo.

En el caso de los tensioactivos se probaron al principio, como indicadores de su presencia en el medio de ensayo, su capacidad de formación de espumas o la medida de la tensión superficial, pero sin demasiado éxito; la reactividad de los tensioactivos aniónicos con el colorante azul de metileno, resultó más exitoso. Por tanto para estos ensayos se define el grado de biodegradabilidad como el porcentaje de eliminación de MBAS eliminado en las condiciones del ensayo.

Los dos métodos de ensayo descritos anteriormente también son adecuados para tensioactivos no iónicos, sin embargo, la principal dificultad consistía en establecer una metodología analítica adecuada. Después de diversos ensayos, el grupo de expertos de la OCDE decidió adoptar el método del tetrayoduro de bismuto de acuerdo con el método de Wickbold, expresando los resultados analíticos como mg/L de BiAS. En el caso de analizar una formulación detergente sería necesaria una prepurificación de la muestra. Estos nuevos procedimientos de ensayo fueron publicados en 1976 (OEDC, 1976) para incluir los métodos analíticos de tensioactivos no iónicos.

Posteriormente se pensó que un parámetro analítico no específico para seguir el curso de la biodegradación resultaría menos costoso, además respondería a cualquier residuo o intermedio de biodegradación, indicando así la extensión de la biodegradación última del tensioactivo ensayado. El grupo de expertos de la OCDE modificó y combinó elementos del ensayo estático con otros métodos de ensayo para otras sustancias.

Se desarrollaron muchas y variadas metodologías de ensayo, pero finalmente se llegó a un acuerdo en la forma de éstos en las denominadas “Guías de Ensayos” para la degradación y acumulación de compuestos tensioactivos. Estas guías fueron elaboradas y recomendadas en 1981 (OECD, 1981). Las metodologías desarrolladas fueron posteriormente incorporadas a las Directivas de la Unión Europea para tensioactivos utilizados en productos de limpieza domésticos e industriales (CEE, 1973b y CEE, 1982)

Las guías de ensayos de la OCDE abarcan tres tipos de ensayos, que se realizan en fases sucesivas, para determinar: a) biodegradabilidad fácil; b) biodegradabilidad inherente; c) comportamiento en condiciones reales (ensayos de simulación):

a) Biodegradabilidad fácil (Ready Biodegradability):

Se aceptaron cinco ensayos (son los llamados RBTs: Ready Biodegradability Tests) basados en parámetros de seguimiento de la biodegradación no específicos tales como el carbono orgánico disuelto, consumo de oxígeno o producción de CO₂. Estos ensayos tienen en común con el ensayo estático que el tensioactivo es la única fuente de carbono y que éste se expone a una cantidad relativamente baja de biomasa microbiana.

Los ensayos recomendados para esta determinación son los siguientes:

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

Todos estos métodos tienen unas características similares:

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

De acuerdo con este tipo de ensayos, se considera que una sustancia es “fácilmente biodegradable” cuando la disminución de la materia activa, tras el ensayo, es superior al 80%, o bien cuando la disminución de algún otro parámetro no específico es superior al 60-70%, esto es; COD (carbono orgánico disuelto) (70%), DBO (demanda bioquímica de oxígeno) (60%) y CO₂ (60%). Se trata de una clasificación totalmente arbitraria de los tensioactivos que han pasado este tipo de ensayos.

Estas pruebas informan sobre la biodegradabilidad última de una sustancia en condiciones difíciles. Los RBTs son los ensayos más importantes para uso práctico aunque también los más estrictos de los publicados por la OCDE. Un resultado positivo denota que la

sustancia desaparece rápidamente. Por tanto, las sustancias que resultan biodegradables por estos métodos, se consideran que en un medio ambiente real, sufrirán una degradación rápida y fácil. Por el contrario, debido a las condiciones tan estrictas del ensayo, un resultado negativo no significa inequívocamente que la sustancia no sea degradable, sino que para asegurarse esta condición, deberían realizarse más ensayos.

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

b) Biodegradabilidad inherente (Inherent Biodegradability):

En este grupo de ensayos se incluyen:

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

En los ensayos de biodegradabilidad inherente la densidad celular utilizada se encuentra en el intervalo 10^7 - 10^8 células/ml. Puesto que se considera que la biodegradabilidad inherente es una propiedad específica de un compuesto, no tiene sentido definir un límite de duración del ensayo. Datos en torno al 20 % de disminución de la materia activa tras el ensayo, pueden considerarse como evidentes de una biodegradación inherente primaria, y datos superiores al 70% en la disminución de parámetros no específicos (consumo de oxígeno, carbono orgánico disuelto, etc...) son indicativos de una biodegradación inherente total.

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

c) Pruebas de simulación:

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

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

De acuerdo con los datos que se obtengan en este tipo de ensayos, se considera que un tensioactivo es totalmente biodegradable en una EDAR con fangos activados, cuando su porcentaje de eliminación del carbono orgánico disuelto sea superior al 70%.

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

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

Finalmente en 1993 la OCDE (OECD, 1993b) publicó una nueva guía de ensayos para biodegradabilidad fácil que contenía seis métodos: COD Die-Away, evolución de producción de CO₂, ensayo estático modificado, respirometría manométrica, ensayo en reactor cerrado y ensayo MITI (I). El medio mineral utilizado es similar en los cuatro primeros ensayos, y la máxima concentración de inóculo permitida varía en un rango de dos órdenes de magnitud para todos los ensayos si no se considera el ensayo estático modificado.

Además de las condiciones expuestas, otra condición arbitraria que se debe cumplir, es que la degradación del compuesto ensayado debería tener lugar dentro de los 10 días siguientes al comienzo del ensayo (14 días para el ensayo en reactor cerrado), considerando como comienzo de la degradación aquel momento en el que desaparece el 10% del sustrato adicionado. Es el llamado criterio “10 days-window” o principio de los diez días. Este criterio está siendo cuestionado por numerosos investigadores y se presenta como inadecuado para clasificar un compuesto como “fácilmente biodegradable” en especial para mezclas comerciales y compuestos de escasa solubilidad (Richerich, 2001). En la última legislación europea, ya se considera como un principio no deseable. La concentración de compuesto y el

inóculo es menos favorable en el ensayo estático modificado que en los otros ensayos, por lo tanto los efectos tóxicos reducen su aplicabilidad.

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

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

En la Tabla II.5 se presenta una lista de métodos para la determinación de la biodegradabilidad total.

Tabla II. 5.- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total (mineralización) de compuestos.

A. Métodos revisados de la OCDE (fácil biodegradabilidad)
301 A COD Die-Away
301 B Evolución en la Producción de CO ₂ (Test de Sturm modificado)
301 C Ensayo MITI ^c (I) (DBO)
301 D Ensayo en Reactor Cerrado (DBO)
301 E Ensayo estático de la OCDE Modificado (COD)
301 F Respirimetría Manométrica (DBO)
B. Métodos de ensayo de la Unión Europea (fácil biodegradabilidad)
C3 Ensayo estático de la OCDE modificado (COD)
C4 Ensayo AFNOR modificado (NF T90/302) (COD)
C5 Ensayo de Sturm modificado (CO ₂)
C6 Ensayo en reactor cerrado (DBO)
C7 Ensayo MITI ^c (I) modificado (DBO)
C8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

Tabla II. 5 (Continuación).- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total (mineralización) de compuestos.

C. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO 7827 Método mediante análisis de carbono orgánico disuelto
ISO 9408 Método mediante respirometría (demanda de oxígeno)
ISO 9439 Método mediante producción de CO ₂
ISO/CD 10,707 Método en reactor cerrado (aún sin implantar)
ISO/CD 10,634 Guía para sustancias insolubles
D. Métodos de la OCDE (inherente biodegradabilidad)
302 A Ensayo de lodos activos en discontinuo (SCAS) modificado (COD)
302 B Ensayo Zahn-Wellens-EMPA ^b modificado (COD o DQO)
E. Métodos de la Unión Europea (inherente biodegradabilidad)
Ensayo SCAS modificado
Ensayo Zahn-Wellens modificado
F. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO 9887 Ensayo SCAS
ISO 9888 Ensayo Zahn-Wellens
G. Métodos de la OCDE (simulación)
303A Tratamiento aerobio de aguas residuales (COD)
H. Métodos de la Unión Europea (simulación)
Ensayo de simulación de lodos activos (COD)
I. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)^a
ISO/TC147/SC5/WG4 N140 Ensayo de simulación de lodos activos (COD)

^a no se diferencia entre ensayos de fácil o inherente biodegradabilidad

^b EMPA: Laboratorios Federales Suizos para el Ensayo e Investigación de Materiales

^c MITI: Ministry of International Trade and Industry (Japón)

2.4.3.1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN

Para la estimación del progreso y la extensión de la biodegradación de un tensioactivo en el sistema bajo observación, existen multitud de métodos analíticos. Estas técnicas pueden hacer uso de propiedades físicas o químicas del propio tensioactivo o de sus intermedios de biodegradación. También es posible medir funciones relacionadas tales como la cantidad de oxígeno consumido o el CO₂ producido por los microorganismos. Cada uno de los métodos analíticos tiene ventajas para su aplicación, pero ninguno de ellos está exento de limitaciones. Muchos de estos métodos no son aplicables a concentraciones excesivamente pequeñas (0.1-10 mg/L), concentraciones de interés en investigación ambiental y en ensayos de biodegradabilidad.

Métodos físicos o no específicos:

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

Métodos químicos o semiespecíficos:

El principio de los métodos químicos consiste en la formación de un compuesto o complejo con el tensioactivo para extraerlo (por transferencia de fases o precipitación), seguido de una determinación colorimétrica o espectrofotométrica.

El principal inconveniente que presentan estos métodos es la baja sensibilidad a los homólogos de menor cadena carbonada.

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

Métodos físico-químicos o específicos:

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

Métodos metabólicos y otros métodos no específicos

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

Merece especial importancia la toma de muestras en los ensayos de biodegradabilidad. A causa de la capacidad de los tensioactivos de adsorberse en las superficies y sólidos en suspensión, es necesario extremar las precauciones a la hora de obtener muestras representativas para su posterior análisis. Una precaución en la toma de

muestras es tomar ésta exenta de espuma así como rellenar completamente el recipiente de la muestra. En el caso de que se tomara una alícuota de la muestra, el recipiente debe someterse a una cuidadosa agitación con un agitador magnético o invertir el recipiente hasta mezclar bien el contenido.

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

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

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

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

- *Métodos cromatográficos*: TLC (cromatografía de capa fina), GC (cromatografía gaseosa) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución).

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

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

2.4.3.2 VARIABLES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADACIÓN

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

Los microorganismos que se utilizan en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad deben ser del tipo de los que realmente se encuentran en las aguas de río, agua de mar, aguas residuales y en los procesos de depuración (autodepuración y tratamiento biológico en plantas

depuradoras), de esta forma los resultados que se obtengan de los ensayos pueden ser extrapolados a la realidad. Aunque son numerosos y variados los microorganismos existentes en estos medios, las bacterias forman la mayor parte de su población por desarrollarse mejor y más rápidamente que otros microorganismos.

La experiencia indica que los mejores resultados en los ensayos de biodegradación se obtienen con un inóculo polivalente de diferentes especies, ya que las poblaciones mixtas proporcionan más información para la predicción del comportamiento de un tensioactivo en un medio natural real. Las especies puras son apropiadas en los estudios de biodegradación en que se quieran aclarar los mecanismos o secuencias de reacciones de la oxidación biológica. Además, la concentración bacteriana es un factor muy importante en los ensayos de biodegradabilidad, ya que afecta a la velocidad de degradación, al período de aclimatación, y por consiguiente al tiempo total de la degradación. Cuando la relación de bacterias a tensioactivo disminuye, el período de adaptación aumenta y la velocidad de degradación disminuye.

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

Puesto que los tensioactivos se usan principalmente en medios acuosos, los ensayos más importantes son los que ocurren en este medio. Ya que los métodos de ensayo de biodegradabilidad suelen representar o simular en el laboratorio las condiciones naturales, se debe utilizar en los ensayos agua de río, mar o agua residual. Sin embargo, si se quieren obtener ensayos reproducibles se recomienda el uso de aguas sintéticas a base de sustancias orgánicas que suministren los elementos necesarios. En algunos casos se utilizan mezclas de medio natural y sintético y en otros casos medios sintéticos que reproducen condiciones naturales y donde el detergente o el tensioactivo es la única fuente de sustancia orgánica, o bien va acompañado de otros nutrientes orgánicos que sirven para ayudar al normal desarrollo de los microorganismos.

Puede ocurrir que, dependiendo del tipo de compuestos y la concentración en el medio, las bacterias inicien su metabolismo a base de otro compuesto orgánico más asequible y no degraden la molécula de tensioactivo hasta que dicho compuesto haya desaparecido

prácticamente, con lo que la degradación del tensioactivo se retarda de forma sensible. Igualmente puede ocurrir que los nutrientes presentes en el medio actúen como agente bacteriostático o bactericida, e incluso comportarse como uno u otro dependiendo de las condiciones del ensayo.

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

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

La mayoría de las bacterias se adaptan y desarrollan dentro de intervalos de pH relativamente amplios, sin embargo, existen algunos microorganismos cuyo desarrollo se inhibe en medios ácidos o alcalinos. Este factor no tiene importancia en los estudios de biodegradación, ya que éstos se llevan a cabo, generalmente en medios neutros o ligeramente alcalinos, que son los más representativos de los medios naturales contaminados. Sin embargo, se observa en los métodos de ensayo de laboratorio una cierta tendencia del medio a cambiar hacia pH ácido como consecuencia de los cambios químicos debido al desarrollo de la población bacteriana. Para amortiguar los cambios excesivos de pH a veces se añaden al medio soluciones tampón.

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

Concentración inicial de tensioactivo

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

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

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

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

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

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

En cualquier caso, las condiciones del ensayo de simulación adoptadas han de ser consideradas a la hora de interpretar y extrapolar los resultados obtenidos.

2.4.3.3 RUTAS DE BIODEGRADACIÓN

Los mecanismos aceptados como principales responsables de la destrucción de una molécula orgánica, son tres: oxidación metílica, β -oxidación y oxidación aromática.

El mecanismo de oxidación metílica es el que interviene en la degradación de las moléculas de hidrocarburos con alto peso molecular y que, como producto final, origina una molécula de ácido graso.

La β -oxidación es la vía normal según la cual se degradan o sintetizan los ácidos grasos, compuestos esenciales para los procesos vitales. En forma resumida, el proceso consiste en un acortamiento de la cadena hidrocarbonada en dos unidades, con liberación de un radical de acetato. Sucesivas etapas de β -oxidación provocan la total conversión de la molécula original en CO_2 , agua y biomasa. En un sistema aeróbico, el hidrógeno termina por desprenderse en forma de agua y, en un sistema anaerobio, en forma de metano o de ácido sulfhídrico.

En el mecanismo de oxidación aromática el resultado es la producción de un compuesto del tipo del ácido-cetoadípico, que se ve sometido posteriormente al mecanismo de β -oxidación hasta su total biodegradación, generando grupos acetato y succinato.

En el caso de las moléculas de tensioactivos, que poseen grupos un tanto especiales, paralelamente o posteriormente a los mecanismos antes mencionados, tienen lugar procesos de hidrólisis o desulfonación, con lo que se originan productos que sufren uno o varios de los mecanismos ya comentados.

2.4.4. TOXICIDAD

2.4.4.1 INTRODUCCIÓN

Bajo este epígrafe el término toxicidad se limita estrictamente a los efectos tóxicos causados por los tensioactivos en el medio acuático, es decir, hablamos de toxicidad acuática. Quedan por tanto al margen los posibles efectos adversos que se puedan provocar en otras áreas, como son la irritación de la piel y la ingestión accidental.

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

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

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

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

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

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

La experiencia demuestra que los ensayos de toxicidad con peces son excesivamente costosos y laboriosos. Por ello, basado en las ventajas de su rapidez, sencillez y economía, se

eligen como métodos de ensayo las bacterias luminiscentes, microcrustáceos *Daphnia magna* y microalgas *Selenastrum capricornutum*.

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

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

2.4.4.2 MECANISMOS DE TOXICIDAD EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

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

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

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

a su vez, una modificación de su actividad biológica (Cserháti, 2002). Los tensioactivos aniónicos influyen la actividad enzimática por unión a enzimas.

Para algas, la sensibilidad al tensioactivo determinado puede diferir dependiendo de la especie. Los tensioactivos pueden desnaturar y unirse a proteínas de la pared celular y alterar la permeabilidad de la membrana. De este modo al afectarse el escalón productor de la cadena alimenticia se pueden presentar repercusiones en las interacciones de la misma y la dinámica de los ecosistemas, más aún cuando las algas contribuyen sustancialmente, con la producción primaria de la mayoría de los hábitats acuáticos (Pavlic, 2005). (Ernst, 1993) citado por Krogh, (Krogh, 2003) demostraron que con el incremento en la hidrofobicidad del tensioactivo en crecimiento del alga *Chlamydomonas reinhardi* se ve reducido. Se ha demostrado que los alcoholes etoxilados ramificados son menos tóxicos que los lineales sobre el alga *Selenastrum capricornutum*.

Para crustáceos la toxicidad de los tensioactivos está relacionada con la estructura de los mismos. Así por ejemplo, de modo general, los alcoholes etoxilados y alquilaminas etoxiladas más hidrofóbicos son más tóxicos que los menos hidrofóbicos (Krogh 2003; Morrall, 2003).

2.4.4.3. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y TOXICIDAD

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

Kimerle (Kimerle, 1977), al estudiar la toxicidad para los homólogos del LAS encontró que la toxicidad aguda se incrementa al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada como se aprecia en la Tabla II.7 donde se muestra la IC_{50} para los diversos homólogos del LAS.

Tabla II.6.- Valores de IC_{50} (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a *Daphnia magna*

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

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

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

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

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

Comparando la toxicidad de los alcoholes grasos etoxilados con la de los alquilfenoles etoxilados, estos últimos resultan menos tóxicos, si bien sus productos resultantes de la degradación (nonilfenol sin etoxilar o con bajo grado de etoxilación) parece que son un tanto “recalcitrantes”, por cuanto su biodegradación es más lenta que la de los correspondientes homólogos de alcoholes grasos sin etoxilar con 1 ó 2 unidades de óxido de etileno.

La Tabla II.8 muestra, para una serie de alcoholes grasos etoxilados y de nonilfenoles polietoxilados, los valores de toxicidad frente a bacterias luminiscentes y frente a la *Daphnia magna* (Ribosa, 1993).

Tabla II.7.- Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC_{50}) y frente a *Daphnia magna* (IC_{50}) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados

UNIDADES DE OE	ALCOHOL GRASO C_{12} - C_{14}		NPEO	
	EC_{50} (mg/L)	IC_{50} (mg/L)	EC_{50} (mg/L)	IC_{50} (mg/L)
2	0.1	1.3	8	2.5
6	0.6	2.1	100	7.6
8	1.6	3.0	150	14.0
10	3.5	4.6	325	19.1

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

1. La toxicidad que presentan los tensioactivos en aguas limpias resulta ser mayor que en aguas contaminadas, debido a la adsorción de los tensioactivos sobre la materia orgánica en suspensión de estas últimas, con lo que se reduce la cantidad de tensioactivo en disolución.

2. Los metabolitos generados en el proceso de la biodegradación resultan menos tóxicos que los productos de partida, con algunas excepciones, como el caso de los alquilfenoles etoxilados.

3. Existe una relación entre la biodegradación y la toxicidad, por cuanto los productos más tóxicos resultan ser los más fácilmente biodegradables.

4. La toxicidad de los tensioactivos se debe, fundamentalmente, a la desestructuración que producen en las membranas celulares, lo que provoca un shock osmótico y unas alteraciones de la permeabilidad de las células; por ello se explica que la mayoría de los tensioactivos resulten más tóxicos para especies de mayor organización biológica como peces que para las *Daphnias*.

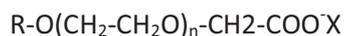
III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TENSIOACTIVOS UTILIZADOS

Para llevar a cabo el presente estudio se han utilizado los siguientes tensioactivos:

Tensioactivos Aniónicos:

- **Ácidos alquil éter carboxílicos:** Suministrados por Kao Corporation S.A, cuya fórmula general es:



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

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	R	n	% Materia Activa	CMC, mg/L ⁽¹⁾
AKYPO® RLM 25	Laureth-4 Carboxylic Acid	C12-C14	≈3	≈ 94	23.3
AKYPO® RLM 100	Laureth-11 Carboxylic Acid	C12-C14	10	≈ 90	41.8
AKYPO® LF1	Capryleth-6 Carboxylic Acid	C8	5	≈ 90	102.5
AKYPO® LF2	Capryleth-9 Carboxylic Acid	C8	8	≈ 89	257.8
AKYPO® LF4	Capryleth-9 Carboxylic Acid + Hexeth-4 Carboxylic Acid	C6-C8	8-3	≈ 89	563.4
AKYPO® LF6	Capryleth-9 Carboxylic Acid + Buteth-2 Carboxylic Acid	C4-C8	8-1	≈ 87	1442.3

Tabla III.1: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados

R: Longitud de cadena

n: grado de etoxilación

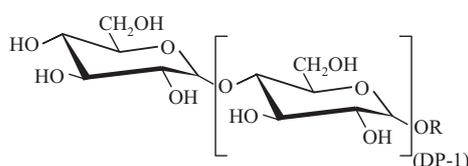
⁽¹⁾: Datos obtenidos por Rincón, (2010) a 25°C.

- **Alquilbenceno sulfonato lineal:** LAS (C11-C14) suministrado por Kao Corporation, S.A. cuya fórmula general es:



Tensioactivo No Iónicos:

- **Alquilpoliglucósidos (APG):** Suministrados por Henkel-Cognis, cuya fórmula general es:



R: Grupo Alquil

DP: Grado de polimerización

Se comercializan como GLUCOPON® y se utiliza como detergente para lavandería y lavavajillas y en otros productos de limpieza.

NOMBRE COMERCIAL	R	DP	PM _{medio} ⁽²⁾	CMC, mg/L ⁽⁴⁾	HLB ⁽³⁾	%Humedad ⁽²⁾
GLUCOPON® 215	C8-C10	1.42	390	1012	12.6	37.0
GLUCOPON® 600	C12-C14	1.59	386	50	12.7	46.6
GLUCOPON® 650	C8-C14	1.35	397	153	12.8	50.4

Tabla III.2: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados

R: Longitud de cadena

DP: Grado de polimerización

CMC: Concentración micelar crítica

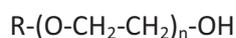
HLB: Balance hidrófilo-lipófilo

⁽²⁾: Bravo (2005)

⁽³⁾: Datos obtenidos por Altmajer (2004)

⁽⁴⁾: Datos obtenidos por Sabahi (2004) a 30°C.

- **Alcoholes grasos etoxilados (AGE):** Suministrados por Kao-Corporation.S.A, de fórmula general:



Este tipo de tensioactivos se comercializan como FINDET, y se utilizan en limpiadores de superficies duras, limpiadores para suelos, desengrasante y en detergentes pesados líquidos y en polvo.

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	R	n	CMC, mg/L ⁽⁵⁾	HLB ⁽⁵⁾
FINDET® 1214N/23	Laureth-11 + Myreth-11	C12 70% C14 30%	11	88.20	14.3
FINDET® 1618A/18	Ceteth-11 + Steareth-11	C16-C18	6	0.81	10.2

Tabla III.3: Propiedades de los alcoholes grasos etoxilados utilizados

R: Longitud de cadena carbonada

n: nº de unidades de óxido de etileno

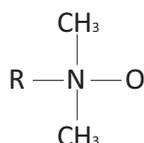
CMC: Concentración micelar crítica

HLB: Balance hidrófilo-lipófilo

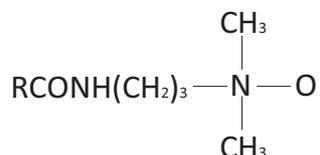
⁽⁵⁾: Jurado (2007)

- **Óxidos de amina:** Suministrados por Kao-Corporation.S.A, de fórmula general:

DM



L75C



Este tipo de tensioactivos se comercializan como OXIDET, y se utiliza como espesante en soluciones de hipoclorito sódico y para la solubilización de fragancias.

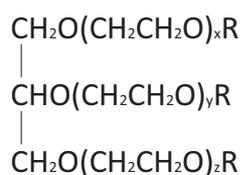
NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	Nº CAS	R	% Materia Activa	CMC, mg/L ⁽¹⁾
OXIDET® DM-4	Myristamine Oxide	3332-27-2	C14	≈ 30	115.7
OXIDET® DM-20	Lauramine Oxide	1643-20-5	C12	≈ 30	158.1
OXIDET® L75C	Cocamidopropylamine Oxide	68155-09-9	$R'\text{CONH}(\text{CH}_2)_3$ R' = C12	≈ 33	199.5

Tabla III.4: Propiedades de los óxidos de amina utilizados

R: Longitud de cadena

(1): Datos obtenidos por Rincón, (2010) a 25°C.

- **Ésteres de glicerina polietoxilados:** Suministrados por Kao.Corporation S.A, cuya fórmula general es:



Donde: R = H o R'-CO⁻ (Cadena de Cononut)

Este tipo de tensioactivos cuyo nombre comercial es LEVENOL®, son usados principalmente en jabón líquido para manos, detergentes líquidos pesados y ligeros, detergente en polvo y limpiadores para suelos.

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	Nº CAS	% Materia Activa	CMC, mg/L ⁽¹⁾
LEVENOL C-201®	Glycereth-17 Cocoate	68201-46-7	≈100	22.7
LEVENOL C-421®	Glycereth-2 Cocoate	68201-46-7	100	12.2

Tabla III.5: Propiedades de los ésteres de glicerina polietoxilados utilizados

(1): Datos obtenidos por Rincón, (2010) a 25°C.

3.2 MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD

3.2.1 ENSAYO ESTÁTICO

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

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

3.2.1.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

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

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

La disolución de ensayo debe estar libre de productos que puedan interferir en la determinación. Ciertos productos químicos, presentes en los medios acuosos o en el aire ambiente, pueden reducir, o incluso inhibir, la actividad de los microorganismos causantes de la biodegradación de los tensioactivos, retrasando el proceso o influyendo en el resultado final. Entre estos productos se encuentran álcalis fuertes, metales tóxicos, bactericidas y disolventes orgánicos. Incluso los propios tensioactivos pueden inhibir la actividad de los microorganismos si se encuentran presentes en concentraciones suficientemente elevadas (Jurado, 2004).

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

3.2.1.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

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

▭ Disolución Nutriente

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

- a. Se disuelven en 1000 ml de agua las siguientes cantidades de productos:
 - 8.5 g de dihidrógenofosfato potásico (KH₂PO₄, P.A.) de Panreac.
 - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K₂HPO₄, P.A.) de Panreac.
 - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O, P.R.S.) de Panreac.
 - 1.7 g de cloruro amónico (NH₄Cl, P.R.S.) de Panreac.
- b. Se disuelven en 1000 ml de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado (MgSO₄·7H₂O, P.R.S.) de Panreac.
- c. Se disuelven en 1000 ml de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl₂, P.A.) de Panreac.
- d. Se disuelven en 1000 ml de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O, P.R.S.) de Panreac.

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

↪ Disolución de tensioactivo a ensayar

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

Para el caso de tensioactivos AKYPO, los cuales se encuentran en forma ácida se ajusta el pH a 7, mediante NaOH 1M y/o HCl 1M.

↪ Disolución de tensioactivo aniónico (patrón blando)

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

↪ Inóculo

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

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

Se ensayaron dos tipos de inóculo: uno proveniente de fangos activados y otro del efluente secundario de la EDAR. Las cantidades ensayadas de ambos inóculos fueron: 5, 15 y 20 ml en 1.2 L de disolución nutriente, con 5 mg/L de tensioactivo aniónico. Los ensayos mostraron que en los 7 primeros días se había degradado el 100% del tensioactivo

utilizando como inóculo agua tratada. Se descartaron los fangos activados como inóculo y cantidades de agua tratada mayores de 5 ml.

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

3.2.1.3. EQUIPOS

A continuación se describen los equipos utilizados en el ensayo estático de biodegradabilidad.

Agitador orbital

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

3.2.1.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

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

3.2.1.5. PROCEDIMIENTO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN

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

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

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

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

Durante los ensayos de biodegradación se toman diferentes muestras para la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) y/o para la medida del carbono total orgánico.

Cuando la concentración de carbono orgánico total residual se mantiene constante con el tiempo se da por finalizado el ensayo de biodegradación.

En la Figura III. 1 se esquematiza el protocolo realizado y los métodos de análisis empleados para la toma de muestras tanto de la disolución de tensioactivo problema como para el tensioactivo control.

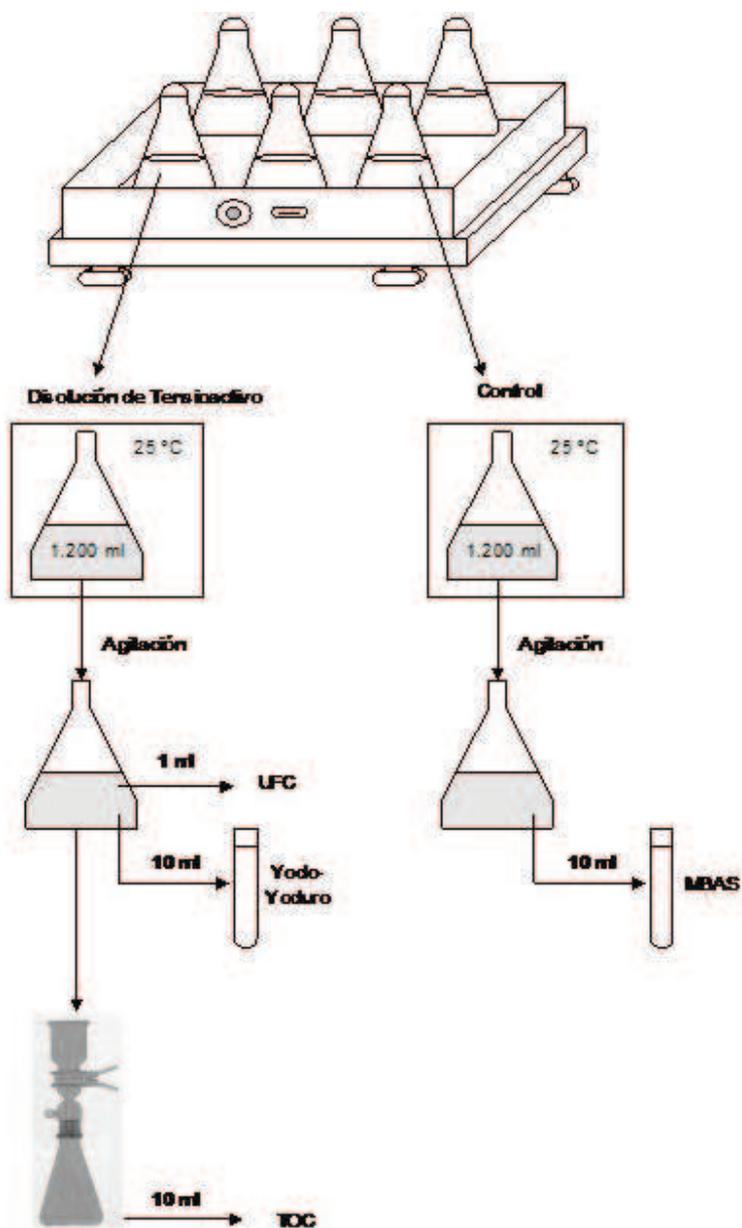


Figura III. 1.- Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación

3.2.1.6. SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN

Para el tensioactivo problema se toman muestras durante los 21 días que como máximo dura el ensayo, siendo la primera de ellas la que sigue a la inoculación, a esta muestra se le denomina muestra a “tiempo cero”. La frecuencia de la toma de muestras depende del tensioactivo y de las medidas de carbono orgánico total.

Para el tensioactivo aniónico utilizado como patrón se analiza la biodegradación el primer y quinto día del ensayo tras la inoculación, aunque también es posible seguir la biodegradación durante los 21 días.

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

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

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

3.2.2 ENSAYO POR EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO

La biodegradación es principalmente un proceso oxidativo. La cantidad teórica de oxígeno requerido para la oxidación completa del compuesto es la misma independientemente del mecanismo: químico o bioquímico. En principio la biodegradabilidad última de un tensioactivo se puede medir como DBO. En la práctica la interpretación de los resultados es dificultosa debido a la extrema complejidad de los procesos metabólicos implicados, ya que el oxígeno es utilizado por los microorganismos para una multitud de reacciones, no únicamente para la oxidación del compuesto.

3.2.2.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los microorganismos existentes en un compartimento ambiental que contiene materia orgánica biodegradable, utilizan oxígeno para sus procesos bioquímicos y producen un volumen equivalente de CO₂.

Si dichos procesos se desarrollan en un sistema cerrado y el CO_2 es absorbido por un álcali fuerte, por ejemplo hidróxido sódico, es posible medir la DBO a partir de una progresiva disminución de la presión interna en el sistema.

3.2.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

☐ Hidróxido sódico (NaOH , P.R.S. de Panreac). Se utiliza para la absorción del CO_2 .

☐ Disolución Nutriente

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

- A. Se disuelven en 1000 ml de agua las siguientes cantidades de productos:
 - 8.5 g de dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K_2HPO_4 , P.A.) de Panreac.
 - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
 - 1.7 g de cloruro amónico (NH_4Cl , P.R.S.) de Panreac.
- B. Se disuelven en 1000 ml de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.
- C. Se disuelven en 1000 ml de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl_2 , P.A.) de Panreac.
- D. Se disuelven en 1000 ml de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.R.S.) de Panreac.

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

☐ Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada (calidad Milli-Q[®] con resistividad de 18.2 M Ω .cm equivalente a la del agua pura). Dependiendo del tensioactivo puede ser necesario someter la disolución a un ligero calentamiento. La disolución de concentración de tensioactivo requerida (entre 0-100 mg/L) se obtiene por dilución de la disolución madre en agua desionizada. Para el caso de tensioactivos AKYPO, los cuales se encuentran en forma ácida se ajusta el pH a 7, mediante NaOH 1M y/o HCl 1M.

3.2.2.3. EQUIPOS

El equipo utilizado para medir la DBO por técnica respirométrica es el sistema comercial Oxitop Control® (WTW, Weilheim, Germany), el cual determina los cambios manométricos que se producen cuando el oxígeno es consumido para transformar el carbono orgánico en CO_2 , y que consta de una unidad de agitación con capacidad para seis botellas de DBO y un controlador para la transmisión de la información al computador y control de los parámetros del ensayo.

Cada botella (fabricada en vidrio) tiene una capacidad nominal de 500 ml, va provista de un alojamiento para reactivos o reservorio de absorción de CO_2 , así como una cabeza enroscada directamente en la botella, la cual mide y almacena la información. La cabeza tiene un sensor que posee con transductor interno de presión que traduce los valores de presión directamente en valores de DBO.

El equipo permite medir valores de presión de 500 a 1100 hPa y de DBO hasta 400000 mg/L O_2 en cada momento, y va registrando los valores obtenidos de forma automática en intervalos de tiempo determinados.

El equipo agitador con las seis botellas se aloja en una estufa termostatzada para mantener la temperatura constante a 25°C durante todo el ensayo, las botellas se incuban en ausencia de luz para evitar las interferencias debidas a la producción de oxígeno fotosintético de algas.



Figura III. 2.- Representación esquemática del equipo respirométrico

3.2.2.4. PROCEDIMIENTO

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos aerobios, procedentes de una población mixta y aireada, en una mezcla formada por la disolución nutriente, y la disolución de ensayo que contiene los tensioactivos a la concentración requerida (entre 0-100 mg/L). El inóculo utilizado se tomó del efluente secundario de una planta de depuración mediante fangos activos que opera con vertidos urbanos (EDAR “Los Vados”). La cantidad de inóculo empleada fue de 0.5 ml por 1200 ml de disolución nutriente (apartado 3.3.1.2.).

Para ensayar la muestra problema, se introducen 420 ml de la disolución anterior en cada una de las botellas de DBO. Una vez que se ha introducido el hidróxido sódico en el recipiente reservorio para la absorción de CO₂ se cierran las botellas herméticamente al enroscar el sensor en la botella. Las botellas se colocan en el agitador que tiene una capacidad de 6 puestos, por lo que normalmente se coloca una botella con el blanco y 5 con la muestra problema para el estudio de la biodegradabilidad final.

El sistema de agitación se dispone en una estufa termostatzada a 25° C ± 1° C equipada con control de temperatura y en ausencia de luz.

3.2.2.5. TOMA DE DATOS Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El equipo de DBO permite registrar y almacenar la disminución de la presión interna de forma continua en el sensor de presión, y la DBO es calculada de acuerdo con la siguiente expresión (Reuschenbach, 2003):

$$DBO = \frac{M(O_2)}{R \cdot T} \cdot \left(\frac{V_{TOTAL} - V_{LIQUIDO}}{V_{TOTAL}} + \alpha \cdot \frac{T_{25}}{T_0} \right) \cdot \Delta p(O_2)$$

Ecuación III. 1

donde:

M(O₂): peso molecular del oxígeno.

R: constante de los gases.

T₀: temperatura a 0°C.

T₂₅: temperatura de incubación (25 °C).

V_{TOTAL}: volumen de la botella.

V_{LIQUIDO}: volumen de líquido contenido en la botella.

α: coeficiente de absorción de Bunsen.

Δp: diferencia de la presión parcial de oxígeno.

El equipo de DBO almacena y registra los valores de DBO cada 112 minutos durante los 28 días que dura el experimento. El cálculo del valor de DBO se basa en la suposición que la presión parcial de oxígeno en la botella es de al menos 60 hPa después de que la medida haya acabado.

Una vez que ha finalizado el ensayo, mediante el controlador OC110 y la correspondiente conexión se transmiten los datos al PC.

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1 ANÁLISIS DE TENSOACTIVOS

3.3.1.1 MÉTODO SIMPLIFICADO DE ANÁLISIS PARA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS ACTIVAS AL AZUL DE METILENO (MBAS)

Para la medida de la concentración de tensioactivos aniónicos se utiliza una simplificación del método que se describe en NORMA UNE EN 903 (UNE EN 903); “Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM”, (Jurado, 2006).

Fundamento del método

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

Reactivos y Disoluciones

- ☐ *Cloroformo* (CHCl_3 , P.A. de Panreac).
- ☐ *Disolución de azul de metileno*, estabilizada a pH ligeramente ácido; se disuelven 0.1 g de azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}\cdot\text{xH}_2\text{O}$, P.A. de Panreac) en 100 ml de la disolución tampón bórax 10 mM y pH 5-6. Esta disolución se guarda en un frasco color topacio.
- ☐ *Disolución madre patrón de dodecilbenceno sulfonato sódico*; se prepara a 1 g/L y pH neutro.
- ☐ *Disolución patrón de dodecilbenceno sulfonato sódico de 10 mg/L*; preparada por dilución 1/100 de la disolución madre patrón.
- ☐ *Solución tampón de tetraborato sódico* ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, P.A. de Panreac) 50 mM y pH 10.5.

Equipos

Espectrofotómetro

Para la medida de la absorbancia se utiliza el espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible de la casa comercial Varian, que permite realizar las medidas a 650 nm de longitud de onda.

Procedimiento

En viales de vidrio para medidas espectrofotométricas de 10 ml de capacidad, se adicionan 5 ml de muestra, y se alcaliniza hasta pH 10 mediante la adición de 200 μ l de tetraborato sódico 50 mM y pH 10.5, a continuación se añaden 100 μ l de azul de metileno de 1 g/L estabilizado. Finalmente se adicionan 4 ml de cloroformo, y tras agitar, se esperan 5 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nm frente a aire o frente a un blanco con cloroformo.

A título de ejemplo se muestra una recta de calibrado para el tensioactivo aniónico LAS.

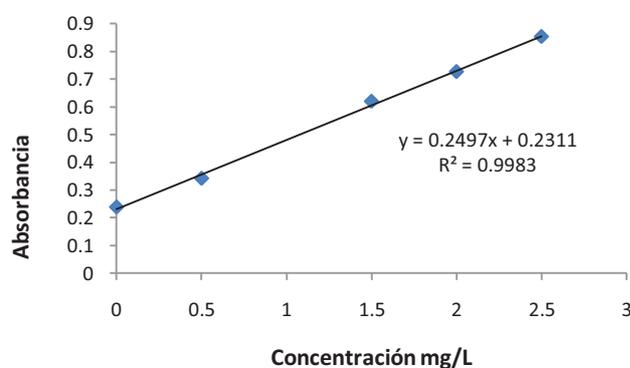


Figura III. 3.- Recta de calibrado para el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno

3.3.1.2 MÉTODO COLORIMÉTRICO DEL YODO-YODURO

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

Fundamento del método

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

Reactivos y disoluciones

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

- *Reactivo yodo-yoduro*; se disuelve 1 g de yodo (calidad Q.P. de Panreac) y 2 g de yoduro potásico (KI, calidad P.A. de Panreac) en 100 ml de agua. Esta solución debe conservarse en frasco de vidrio color topacio y se renueva cada 8 días.
- *Solución madre patrón de tensioactivo no iónico de 1 g/L*.
- *Solución hija patrón de tensioactivo no iónico de 0.020 g/L* preparada por dilución 1/50 de la solución madre patrón.

Equipos

Espectrofotómetro

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

Procedimiento

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

La evaluación de los resultados se realiza por medio de una recta de calibrado, para cada una de las medidas de la muestra, que da directamente el contenido de tensioactivo no iónico expresado en mg/L. La curva de calibrado debe prepararse con el tensioactivo no iónico de que se trate en cada caso, puesto que es diferente para cada uno.

En la Figura III.4 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo Findet 1214N/23.

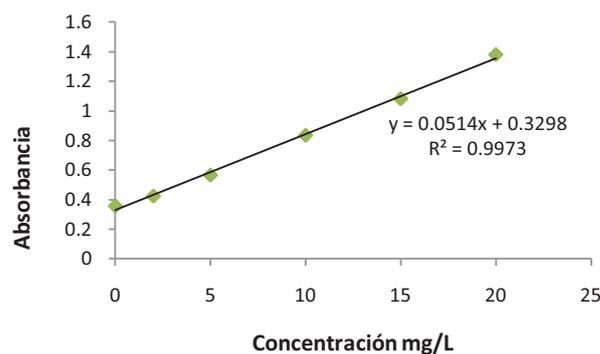


Figura III.4.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro

3.3.1.3. MÉTODO DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL (TOC)

La determinación del TOC, se ha utilizado para llevar a cabo el seguimiento de la biodegradabilidad de diferentes tensioactivos durante el ensayo estático. Los resultados de carbono orgánico total servirán para determinar la concentración residual de tensioactivo que queda en el ensayo y observar cómo se biodegrada con el tiempo.

Fundamento del método

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

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

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

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

cuya área es calculada por un procesador de datos, siendo ésta proporcional a la cantidad de TC presente en la muestra.

El carbono inorgánico es determinado mediante un reactor IC en el que el gas portador se encuentra fluyendo continuamente en forma de pequeñas burbujas en el seno de una solución de ácido fosfórico al 25%. Al inyectar la muestra en el reactor, todo el carbono presente en la misma en forma de CO_2 disuelto, carbonato o bicarbonato, es transformado en CO_2 gaseoso que es arrastrado y detectado por el NDIR del mismo modo descrito anteriormente para el TC.

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

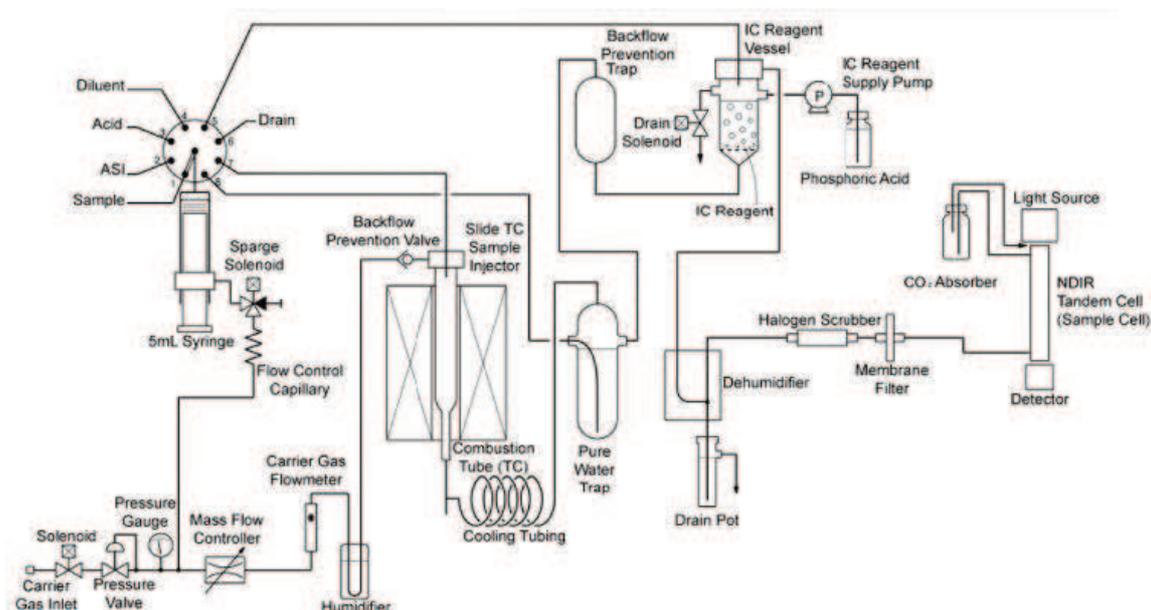


Figura III.5.- Diagrama de Flujo TOC

Reactivos

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

- *Ácido Clorhídrico*. Utilizado para obtener un pH inferior a 3 durante el análisis del IC.
- *Ácido fosfórico*
- *Hidróxido sódico*. Utilizado como absorbedor del CO_2
- *Agua desionizada*. Utilizada por el equipo para las diluciones programadas y para la limpieza y lavado del mismo.

- Disolución patrón 1000 ppm IC, se disuelven 3.5 g de bicarbonato sódico y 4.41 g de carbonato sódico en 1 L de agua.
- Disolución patrón 1000 ppm TC, se disuelven 2.125 g de biftalato potásico en 1 L de agua.

Equipos

Medidor de TOC

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

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

Figura III.6- Especificaciones TOC

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

Figura III.6 (Continuación).- Especificaciones TOC

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

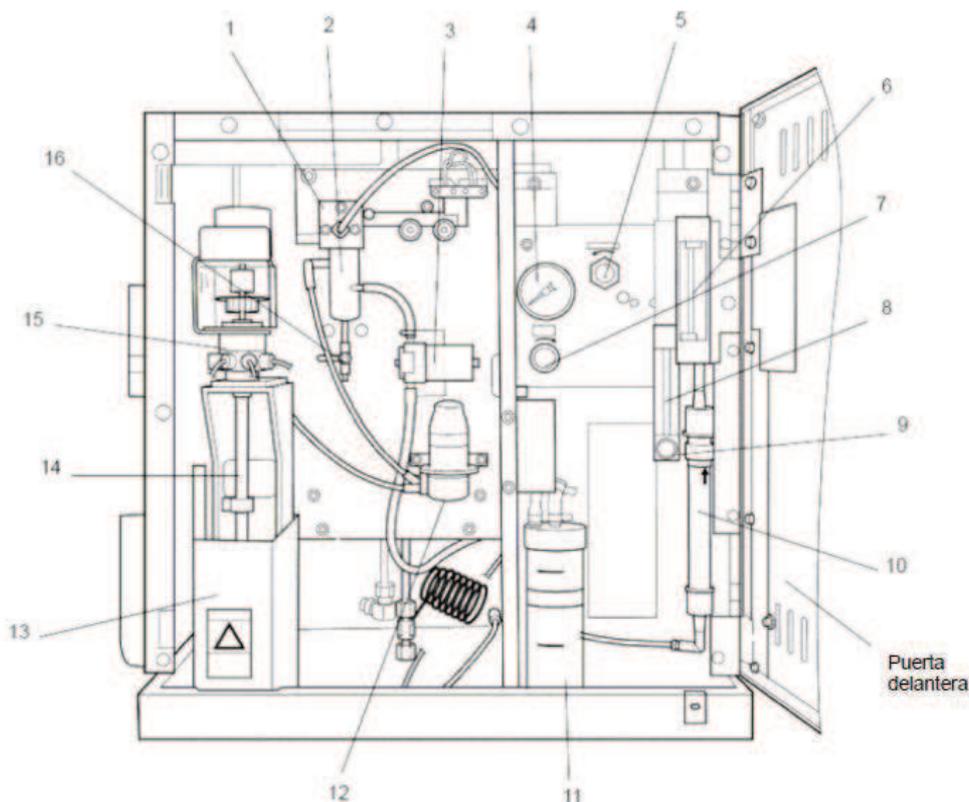


Figura III.7- Visión interior del equipo de medición del TOC

Donde:

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

Procedimiento

Calibración y puesta en funcionamiento del TOC.

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

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

Preparación de las muestras

Las muestras que son extraídas del ensayo estático al principio, final y durante su desarrollo, son analizadas para determinar la concentración de tensioactivo presente en ellas, para ello se evalúa el Carbono Orgánico Total (TOC), mediante el equipo anteriormente descrito.

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

Medida y toma de datos

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

Finalizadas las mediciones se obtienen los datos requeridos de TOC, IC o TC.

3.3.2 RECUENTO DE LA BIOMASA

3.3.2.1. FUNDAMENTO

Las curvas de crecimiento son un método alternativo para evaluar la biodegradación de tensioactivos cuando éstos son la única fuente de carbono del medio de cultivo. Inicialmente se inocula un pequeño número de microorganismos en el medio y se registra el número de microorganismos viables en función del tiempo.

El modelo de crecimiento basado en el número de células viables tiene cuatro fases más o menos diferenciadas:

- 1) *Fase de retardo*. Tras la adición de un inóculo al medio de cultivo, la fase de retardo representa el tiempo requerido para que los microorganismos se aclimaten a sus nuevas condiciones ambientales.
- 2) *Fase de crecimiento logarítmico*. Durante este periodo, la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar alimento.
- 3) *Fase estacionaria*. En este caso la población permanece estacionaria. Las razones que se apuntan para este fenómeno son: a) que las células han agotado el sustrato o nutrientes necesarios para el crecimiento, y b) que el crecimiento de nuevas células se nivela por la muerte de células viejas.
- 4) *Fase de muerte logarítmica o crecimiento decreciente*. Durante esta fase la tasa de muerte de las bacterias excede la población de células nuevas. Los microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin reposición del mismo, ya que la concentración de sustrato disponible se halla en un mínimo. Durante esta fase puede darse el fenómeno llamado *lisis* según el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden con objeto de proporcionar alimento a las células existentes.

3.3.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- *Disolución de NaCl al 0.9%*. NaCl de calidad P.A. de Panreac.
- *Agar nutritivo de Cultimed* suministrado por Panreac.

3.3.2.3. EQUIPOS

Autoclave

Utilizado para esterilizar el medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos así como el material necesario. Autoclave eléctrico semiautomático con temperaturas regulables de 105 a 150 °C. Modelo Autester-G de SELECTA P.

Cabina de flujo laminar horizontal

Utilizada para el cultivo de unidades formadoras de colonias en condiciones estériles en los ensayos estáticos de biodegradación. Permite trabajar en condiciones de esterilidad y en ausencia de partículas mediante un barrido continuo de la zona de trabajo. Incluye lámpara germicida de U.V. Modelo Micro-V de la casa TELSTAR.

Contador de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Para el recuento de las unidades formadoras de colonias en los ensayos estáticos de biodegradación se utiliza un contador automático "Counterstat Flash" de IUL instrument, que permite contar las UFC de forma automática.

3.3.2.4. PROCEDIMIENTO

El número de microorganismos viables se obtiene mediante recuento heterótrofo en placa, expresándose el resultado como unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

El medio de cultivo, agar nutritivo, permite la detección de una amplia variedad de microorganismos. Con una pipeta estéril se toma 1 ml de muestra del cultivo y se hacen una serie de diluciones seriadas 1:10 en CINA al 0.9% hasta alcanzar una dilución de microorganismos entre 30 y 80 células viables por ml de solución de prueba.

Cada dilución se analiza por duplicado: sobre una placa de Petri de 10 cm de diámetro se añade 1 ml de la muestra a analizar. Se vierten, a continuación, 20 ml del medio de cultivo previamente esterilizado, fundido y atemperado a 60°C y se agita suavemente hasta su total homogenización. Se deja enfriar hasta su completa solidificación y se incuba a 25°C durante 72 horas en la oscuridad. El número total de microorganismos se obtiene multiplicando el número de UFC por el factor de dilución correspondiente.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

3.4.1 ENSAYO TOXICIDAD LUMISTox

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

3.4.1.1. FUNDAMENTO

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

3.4.1.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

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

3.4.1.3. EQUIPOS

LUMISTox

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

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

Unidad de incubación

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

3.4.1.4 PROCEDIMIENTO

Reactivación de las bacterias luminiscentes

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

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

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

Preparación de la muestra y de la serie de dilución

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

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

Medida

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

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

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

3.4.1.5. EVALUACIÓN

Efecto Inhibidor sobre las bacterias luminiscentes

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

$$f_k = \frac{I_t(0)}{I_0(0)}$$

Ecuación III. 2

donde:

f_k : factor de corrección para el tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.

$I_0(0)$: intensidad luminosa a tiempo cero, antes de la adición de la suspensión de bacterias.

$I_t(0)$: intensidad luminosa tras un tiempo de incubación de 15 o 30 minutos.

La intensidad luminosa se expresa en unidades de luminiscencia relativa.

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

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

Ecuación III. 3

Donde:

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

Ecuación III. 4

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

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

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} = \frac{f_k \cdot I_0(c) - I_t(c)}{I_t(c)}$$

Ecuación III. 5

siendo:

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

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

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

$$\log(C) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a)$$

Ecuación III. 6

Una reducción de luz del 50% corresponde a un valor de $\Gamma = 1$, ya que en este caso la intensidad de luz perdida será igual a la intensidad de luz remanente. En la Figura III.8 se presenta, a título de ejemplo, la linealización para el tensioactivo Akypo LF1.

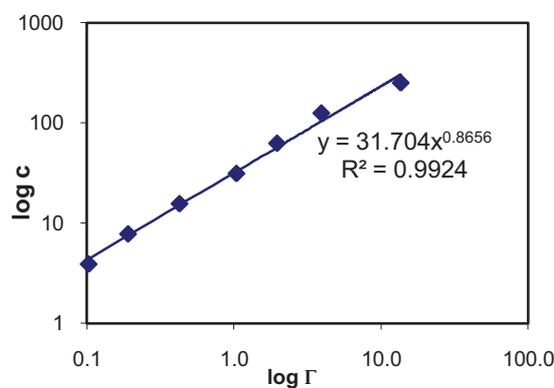


Figura III.8.- Relación lineal entre la función Γ y la concentración para el tensioactivo AKYPO LF1

3.4.1.6. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC

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

3.4.2 ECOTOXICIDAD *DAPHNIA MAGNA*

La medida de la ecotoxicidad mediante el ensayo con *Daphnia magna*, se ha realizado conforme a la Norma UNE-EN ISO 6341:1996 (UNE EN ISO 6341:1996), utilizando micro crustáceos *Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)* como organismos de prueba. El test se realiza mediante el Kit DAPHTOXKIT F™ magna, de acuerdo con la norma ISO 6341 y con OECD guideline 202 (OECD, 1984a).

3.4.2.1. FUNDAMENTO

La medida de la toxicidad se basa en la muerte o inmovilización de los microcrustáceos como consecuencia de la exposición durante 24 horas con la sustancia tóxica.

3.4.2.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- *Efipios de Daphnia magna*, en tubos de plástico cubiertos con papel de aluminio suministrados por MicroBioTest Inc. Deben almacenarse en refrigeración a 5°C (+/- 2º °C).
- *Agua dulce (Freshwater)*. Disolución de sales preparada en 2 L de agua desionizada, añadiendo los viales suministrados en el DAPHTOXKIT F™. Y respetando la secuencia siguiente:

1. Vial 1. Disolución de $NaHCO_3$
2. Vial 2. Disolución de $CaCl_2$
3. Vial 3. Disolución de $MgSO_4$
4. Vial 4. Disolución de KCl

Una vez preparada debe conservarse en refrigeración y en oscuridad.

- *Spirulina en polvo*, para la prealimentación de las daphnias.

- Disolución de tensioactivo a ensayar.

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

Para el caso de tensioactivos AKYPO, los cuales se encuentran en forma ácida se ajusta el pH a 7, mediante NaOH 1M y/o HCl 1M.

3.4.2.3. EQUIPOS

Estufa de incubación

Incubador para mantener a temperatura constante entre 20-22°C y con iluminación de 6000 lux, para la incubación de los efipios de *Daphnia magna*, "Aqua Lytic" de LIEBHERR, y proporcionado por Microbiostest Inc.

Compresor

Compresor para proporcionar el bombeo de aire necesario para la aireación del agua dulce, PiluoPro 3w, 50 Hz.

3.4.2.4. PROCEDIMIENTO

A) Incubación de los efipios de *Daphnia magna*

Los efipios de *Daphnia magna* constituyen la estructura que protege los huevos de *Daphnia magna*, cada efipio contiene dos huevos, de los cuales nacerán dos Daphnias.

Los efipios se sacan de los viales de almacenamiento, se elimina el líquido de conservación y se lavan con agua del grifo para eliminar todas las trazas del medio de almacenamiento.

Se colocan los efipios de *Daphnia magna* en una placa petri con 15 ml de agua dulce que debe ser previamente aireada durante 15 minutos y atemperada a 20-22°C.

El desarrollo embrionario de los huevos de *Daphnia magna* necesita 3 días en óptimas condiciones (20-22°C a 6000 lux), pero en ocasiones algunos neonatos pueden aparecer antes de las 72 h de incubación. Éstos deben ser desechados, ya que el test debe realizarse con organismos de menos de 24 horas de vida.

Cada 24 horas es necesario renovar el agua dulce y sustituirla por una nueva aireada y atemperada.

Entre 72h y 80h, tiene lugar la eclosión de la mayoría de los huevos. A partir de este tiempo se dispone de los organismos para ser testados. Dos horas antes de que sean puestos en contacto con el tensioactivo deben ser prealimentados con una suspensión de spirulina, la cual les proporciona una reserva de energía y evita la muerte por inanición.

B) Puesta en contacto con la disolución de Tensioactivo

Para poner el contacto las daphnias con las disoluciones de tensioactivo se utiliza una placa "multipocillos". Para conseguir una evaluación estadística aceptable del efecto, cada concentración de tensioactivo debe ser ensayada en 4 réplicas.

Las placas con los pocillos están provistas de 4 pozos para cada concentración de tóxico y 4 pozos para el test de control. A la izquierda la placa está provista de una celdilla de lavado para evitar la dilución de la concentración de tensioactivo durante la transferencia de los organismos desde la placa petri.

Cada uno de los pozos será llenado con 10 ml de la correspondiente disolución de tóxico. Una vez llenos se transfieren al menos 20 neonatos desde la placa petri hasta cada pocillo de lavado. Del pocillo de lavado se transfieren exactamente 5 neonatos hasta cada pocillo. Es necesario prestar especial atención en que ninguno de los organismos quede flotando en la superficie debido a que las daphnias son susceptibles de quedar atrapadas en la superficie del líquido por el fenómeno de tensión superficial.

La placa multipocillos será cubierta con parafilm, y su correspondiente tapadera y se mantiene a en estufa de incubación termostatzada a 20°C en oscuridad durante 24 horas.

3.4.2.5. EVALUACIÓN

Una vez han transcurrido 24 horas desde la puesta en contacto con el tensioactivos se evalúa el número de organismos inmovilizados, considerándose éstos como los neonatos que

no son capaces de nadar después de una suave agitación del líquido por 15 segundos, incluso si aún pueden mover sus antenas.

Sumando el número de inmovilizados para cada concentración y dividiendo por el número total de organismos testados para cada concentración (20) se obtiene el % de efecto.

$$\% \text{ Efecto} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ Inmovilizados}}{20}$$

Ecuación III. 7

3.4.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE IC

El valor de la toxicidad se mide como IC_{50} , que es la concentración de tensioactivo en mg/L que produce la inmovilización del 50% de la población después de 24 horas de exposición con el tóxico.

El cálculo se realiza representando el logaritmo de la concentración de tensioactivo en función del % de efecto. En dicha representación los datos se pueden ajustar a una línea recta mediante el método de mínimos cuadrados, de forma que:

$$\log[\text{tensioactivo}] = A \cdot \% \text{ efecto} + B$$

Ecuación III. 8

Evaluando para 50% de efecto se obtiene el valor para EC50

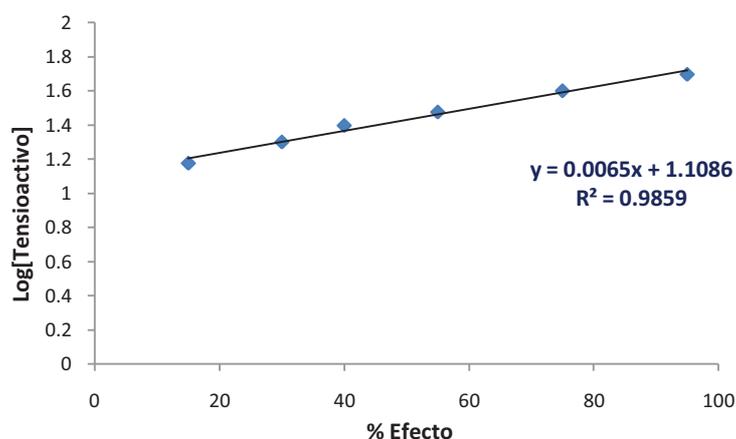


Figura III. 9.- Relación lineal entre % Efecto y la concentración para el tensioactivo OXIDET DM-20

3.4.3 ECOTOXICIDAD MICROALGAS

3.4.3.1. FUNDAMENTO

La medida de la ecotoxicidad mediante el ensayo con Microalgas, se ha realizado conforme a la Norma UNE-EN ISO 28692:1994, basado en la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce, *Selenastrum capricornutum*. El test se realiza mediante el Kit ALGALTOXKIT F™, de acuerdo con la norma ISO 28692 y con OECD Guideline 201 (OECD, 1984b).

El test se basa en la medida de la densidad óptica a 670 nm en suspensiones de algas a las que se le añade el tóxico en determinadas concentraciones, en comparación con una disolución en la que no se ha añadido tóxico. Las medidas se realizan en cubetas de 10 cm de paso de longitud. Las medidas de densidad óptica (OD) pueden ser fácilmente convertidas en nº de algas con ayuda de una recta de regresión patrón proporcionada en el Kit.

3.4.3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- ⌞ *Algas Selenastrum capricornutum*, en forma de rosario inmovilizadas en una matriz inerte y suministrados por MicroBioTest Inc. Deben almacenarse en refrigeración a 5°C (+/- 2º °C).
- ⌞ *Disolución para disolver la matriz de inmovilización (Matrix dissolving médium)*, suministrado por MicroBioTest Inc.
- ⌞ *Medio de cultivo para algas*. Preparado a partir de 1L de agua desionizada añadiendo los siguientes volúmenes de los viales suministrados en el ALGALTOXKIT F™

1. 10 ml Nutriente Stock A
2. 1 ml Nutriente Stock B
3. 1 ml Nutriente Stock C
4. 1 ml Nutriente Stock D

Ajustar el pH si es necesario a 8.1 +/-0.2 con disoluciones 1M HCl y/o 1M de NaOH.

Una vez preparada debe conservarse en refrigeración y en oscuridad.

- ⌞ Disolución de tensioactivo a ensayar.

Se prepara una disolución de tensioactivo de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada (calidad Milli-Q[®] con resistividad de 18.2 MΩ.cm equivalente a la del agua pura). Dependiendo del tensioactivo puede ser necesario someter la disolución a un ligero calentamiento. La disolución de concentración de tensioactivo requerida se obtiene por dilución de la disolución madre en medio de cultivo.

Para el caso de tensioactivos AKYPO, los cuales se encuentran en forma ácida se ajusta el pH a 7, mediante NaOH 1M y/o HCl 1M.

3.4.3.3. EQUIPOS

Equipo de incubación

Incubador para mantener a temperatura constante a 23°C +/- 2°C y con iluminación de al menos 10000 lux por los lados de las cubetas y de 3000-4000 lux en el fondo de las mismas., “Aqua Lytic” de LIEBHERR, y proporcionado por Microbiostest Inc.

Espectrofotómetro

Para la medida de la densidad óptica se utiliza el espectrofotómetro Cary 100 Bio UV-Visible de la casa comercial Varian, que permite realizar las medidas para cubetas de 10 cm de paso de luz a 670 nm de longitud de onda.

Compresor para aireación

Compresor para proporcionar el bombeo de aire necesario para la aireación del agua dulce, PiluoPro 3w, 50 Hz.

Centrifuga

Utilizada en la desinmovilización de las algas a 3000 rpm. Modelo Universal 320R de HETTICH ZENTRIFUGEN.

3.4.3.4. PROCEDIMIENTO

A) Desinmovilización de las algas

Las algas son suministradas en forma de cuentas de rosario en una matriz inerte. En primer lugar se elimina esta matriz y se procede a la desinmovilización de las algas hasta obtener una suspensión de las mismas en medio de cultivo. El procedimiento es el siguiente:

1. Eliminación de la matriz de inmovilización del tubo que contiene las algas.
2. Añadir 5ml de “Matrix dissolving medium” y agitar vigorosamente. Repetir la agitación cada 2 minutos hasta que las algas queden completamente liberadas y en suspensión.
3. Centrifugar el tubo durante 10 minutos a 3000 rpm
4. Eliminar el sobrenadante y reemplazarlo por 10 ml de agua desionizada.
5. Agitar de nuevo vigorosamente y para resuspender las algas homogéneamente.
6. Centrifugar el tubo de nuevo durante 10 minutos a 300 rpm.
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de medio de cultivo.

B) Preparación del inóculo concentrado de algas

A partir de la suspensión de algas anteriormente preparada es necesario conseguir una concentración de algas de $1 \cdot 10^6$ algas/ml, que será añadida a las disoluciones de tóxico. Para conseguirlo se procede de la siguiente forma:

1. Añadir la suspensión de algas desinmovilizada en un matraz de 25 ml y añadir medio de cultivo hasta completar el volumen.
2. Añadir el contenido en una celda de 10 cm de paso y medir la OD a 670 nm en el espectrofotómetro. Hacer el cero previamente con una celda de las mismas dimensiones con medio de cultivo.
3. Con el valor de OD obtenido, sustituyendo en la recta patrón se obtiene la concentración del nº de algas N1.
4. Calcular el factor de dilución para obtener una concentración N2 de $1 \cdot 10^6$ algas/ml.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{N1}{N2}$$

Ecuación III. 9

5. Transferir el contenido a un matraz de 100 ml, y añadir el volumen necesario para obtener la concentración $1 \cdot 10^6$ algas/ml.
6. Transferir 25 ml a la cubeta de medida y comprobar que la concentración obtenida es la necesaria.
7. En caso de que la concentración sea superior volver a realizar la operación anterior. En caso de que sea inferior concentrar la suspensión por sedimentación natural de las algas (30 min a 1 h), y succionar una parte del líquido procedente de la parte superior de la cubeta. Repetir la operación de dilución.

C) Preparación de las disoluciones alga-tóxico.

Se preparan 5 concentraciones de 100 ml de tóxico a partir de medio de cultivo, y otra disolución de 100 ml de únicamente medio de cultivo sin tóxico, que servirá de control.

A cada una de las disoluciones preparadas se añade 1ml de la concentración de $1 \cdot 10^6$ algas/ml, con el fin de obtener una concentración de algas de $1 \cdot 10^4$ /ml en cada caso.

Para una evaluación estadística aceptable de la inhibición del crecimiento cada concentración de tóxico así como el control (sin tóxico) debe ser ensayada en tres réplicas. El Algaltokit contiene un set de 18 cubetas transparentes de 10 cm de paso, para ensayar 5 concentraciones diferentes (C1, C2, C3, C4 Y C5) y una de control (C0) por triplicado (A, B, C).

Tras agitar fuertemente se transfieren 25 ml desde las disoluciones a las cubetas de incubación.

Por último se mide en el espectrofotómetro la OD para cada cubeta.

D) Incubación de las cubetas

Las cubetas son colocadas en el set con la tapadera abierta por uno de los lados colocando un trozo de plástico entre el tapón y la celda. A continuación se recubre con parafilm para evitar evaporaciones.

Las cubetas han de ser colocadas de forma aleatoria para compensar las posibles diferencias por la posición de cada una de las cubetas.

La incubación se realiza durante 72h en un incubador de temperatura controlada y constante a 23°C +/- 2°C, y con iluminación de al menos 10000 lux por ambos lados de las cubetas y 3000-4000 lux por el fondo.

La orientación de las cubetas debe ser siempre la misma durante las 72 horas que dura el proceso de incubación.

El protocolo estándar para test de toxicidad establece que las algas deben estar continuamente en suspensión para facilitar la transferencia de CO₂, y reducir la variación de pH, sin embargo detalladas investigaciones revelan que la resuspensión una vez al día inmediatamente antes de medir la OD es suficiente para obtener el mínimo número de divisiones de algas prescrito en el procedimiento estándar.

E) Medida de la Densidad Óptica

El seguimiento de la inhibición del crecimiento se realiza midiendo la OD a 670 nm a 0h, 24h, 48h y 72h.

Justo antes de realizar la medida es necesario agitar fuertemente durante 10 segundos, a continuación esperar 10 segundos en reposo y anotar el valor dado por el espectrofotómetro a 670 nm, previamente calibrado con medio de cultivo. La medida debe realizarse siempre con la misma orientación de las cubetas, para ello las cubetas están serigrafiadas con una flecha que siempre debe indicar hacia la izquierda.

Una vez que se mide la OD para todas las cubetas, es necesario volver a colocarlas de forma aleatoria en el set, dejándolas abiertas por uno de los lados.

3.4.3.5 EVALUACIÓN

Una vez obtenidos los datos se obtiene la media de la OD para cada concentración y cada tiempo de medida.

Con estos valores mediante representación de Log(OD) frente al tiempo, se obtiene una línea recta. A partir de la pendiente de la misma se puede obtener la tasa de crecimiento para cada concentración y a partir de la cual se puede observar el correcto crecimiento de las algas. Dicha tasa de crecimiento (μ) también se puede evaluar mediante:

$$\mu(Cx) = \frac{\log OD_{72 \text{ horas}} - \log OD_{0 \text{ horas}}}{72 \text{ horas}}$$

Ecuación III. 10

Con la tasa de crecimiento para cada concentración (μ_{cx}) y para el control (μ_{co}) se puede evaluar la Tasa de inhibición (γ), para cada concentración, ésta se evalúa como:

$$\% \gamma(Cx) = \frac{\mu_{co} - \mu_{cx}}{\mu_{co}} \cdot 100$$

Ecuación III. 11

3.4.3.6. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC

El valor de la toxicidad se mide como EC_{50} , que es la concentración de tensioactivo en mg/L que produce una inhibición del 50% en el crecimiento después de 72 horas de exposición con el tóxico.

El cálculo se realiza representando el logaritmo de la concentración de tensioactivo en función de la Tasa de Inhibición en %. En dicha representación los datos se pueden ajustar a una línea recta mediante el método de mínimos cuadrados, de forma que:

$$\log[\text{tensioactivo}] = A \cdot \% \gamma + B$$

Ecuación III. 12

Evaluando para 50% de tasa de Inhibición se obtiene el valor para EC_{50}

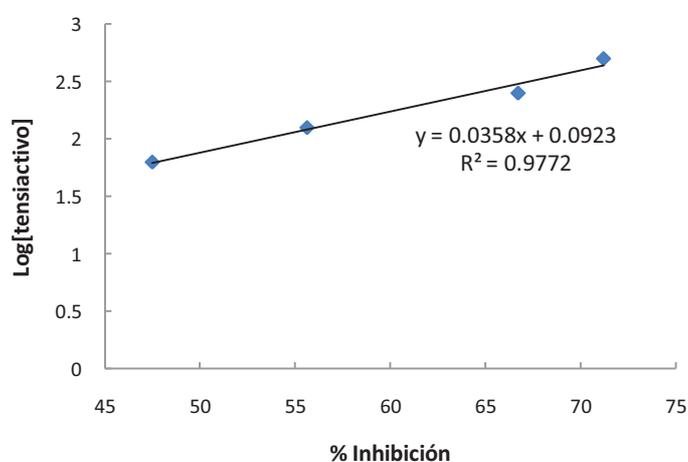


Figura III. 10.- Relación lineal entre % Inhibición y la concentración para el tensioactivo AKYPO LF2

3.5 PROTOCOLO DE LIMPIEZA

3.5.1 LIMPIEZA DEL MATERIAL CORRIENTE DE LABORATORIO

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

- Limpieza del material de vidrio con mezcla crómica (H_2SO_4 , $K_2Cr_2O_7$) de Scharlau Chemie, S.A.
- Enjuague con agua corriente.
- Enjuague final con agua desionizada.

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

IV.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

En este capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de biodegradabilidad y toxicidad para los tensioactivos ensayados.

4.1 BIODEGRADABILIDAD DE TENSIOSACTIVOS

En las Tabla IV.1 a IV.12 se muestran los resultados experimentales que se han obtenido en los ensayos de biodegradación. En estas tablas se muestra el tensioactivo ensayado, el tipo de ensayo y el método de análisis utilizado.

4.1.1 BIODEGRADABILIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

Tabla IV.1- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el tensioactivo AKYPO LF2

Tensioactivo:	AKYPO LF2				
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO				
Medida de la concentración:	TOC				
EXPERIMENTO: E-1	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L
0.00	1.82	4.20	9.38	14.36	26.28
24.00	3.68	10.52	13.30	17.00	29.68
48.00	3.95	3.43	8.46	12.30	24.67
120.00	3.54	2.08	4.56	7.33	17.60
144.25	3.18	3.57	3.83	4.36	16.86
168.25	6.06	1.96	3.69	3.61	15.30
192.25	1.48	2.65	2.34	3.24	13.25
216.25	1.40	2.20	1.22	2.34	11.47
288.25	1.30	1.38	2.94	3.09	9.71
312.50	1.75	1.60	2.21	2.36	6.49
336.50	1.04	1.43	1.62	3.27	7.87
360.50	1.21	2.41	2.02	2.59	5.24
384.50	1.35	1.32	2.34	2.21	4.62
456.50	1.57	1.36	1.11	1.06	2.75
480.50	1.16	1.43	1.57	1.26	3.74
504.50	1.60	1.32	1.42	1.18	1.85

Tabla IV.2- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el tensioactivo AKYPO RLM-25

Tensioactivo:	AKYPO RLM-25				
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO				
Medida de la concentración:	TOC				
EXPERIMENTO: E-2	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L
0.00	0.92	2.95	7.56	12.32	22.73
23.00	4.40	4.81	8.98	13.91	25.80
47.00	1.32	1.89	9.73	7.95	19.88
119.50	1.14	2.02	4.24	6.30	16.58
143.00	2.04	2.09	4.15	7.66	23.12
167.00	2.66	1.83	5.22	6.43	16.96
191.00	1.29	1.26	2.35	5.38	16.89
215.00	1.09	1.62	2.11	5.85	14.25
287.00	1.23	1.19	2.15	5.25	11.38
311.00	1.36	1.57	1.77	4.74	11.15
335.00	1.54	1.66	2.14	6.62	11.37
359.00	1.01	0.87	1.12	4.36	10.66
383.00	1.53	3.98	2.32	5.98	11.58
455.00	1.52	1.84	4.57	4.60	10.36
479.00	1.01	1.16	2.26	5.30	10.43
503.00	1.40	1.18	2.21	4.43	11.75

Tabla IV.3- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el tensioactivo AKYPO RLM-100

Tensioactivo:	AKYPO RLM-100				
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO				
Medida de la concentración:	TOC				
EXPERIMENTO: E-3	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L	TOC, mg/L
0.00	0.68	2.89	6.57	11.74	24.28
24.25	3.84	2.40	10.47	13.53	24.39
48.75	1.28	2.47	9.66	12.87	25.41
120.00	1.81	1.04	4.27	9.25	18.35
145.00	1.32	1.68	8.42	17.81	23.29
169.50	2.81	1.27	5.22	6.07	18.74
193.00	2.51	1.77	2.49	4.68	17.39
289.00	1.33	1.77	3.95	5.65	16.50
313.25	5.35	-0.15	5.94	5.40	15.91
337.00	2.96	1.92	2.86	2.22	13.52
361.00	0.75	0.90	1.40	2.17	13.35
385.00	2.32	2.77	1.76	3.93	13.50
457.25	0.83	-0.36	1.42	2.50	12.25
481.00	0.68	-0.21	1.39	1.50	11.78
505.00	0.78	-0.20	1.31	2.18	11.85

Tabla IV.4- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo AKYPO LF2

Tensioactivo:	AKYPO LF2				
Ensayo de Biodegradación:	Botellas Respirométricas				
Método de Análisis:	DBO				
EXPERIMENTO: BR-1	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L
0.00	0	0	0	0	0
18.67	2.4	4.1	5.3	2.4	4.1
37.33	4.1	5.9	7.1	4.1	5.9
56.00	8.3	9.4	11.2	8.3	10
74.67	8.9	10	11.8	8.9	10.6
93.33	7.7	8.9	10.6	7.7	10
112.00	6.5	7.7	9.4	5.9	8.3
130.67	8.3	8.9	10.6	7.7	10
149.33	9.4	11.2	12.4	9.4	11.8
168.00	11.2	12.4	14.2	10.6	13
186.67	11.8	13.6	15.4	12.4	13.6
205.33	10	11.2	13	9.4	11.8
224.00	7.7	8.9	10	7.1	8.9
242.67	5.9	7.7	8.9	5.9	7.7
261.33	6.5	7.7	8.9	5.9	8.3
280.00	5.9	7.1	8.9	5.9	7.7
298.67	4.7	5.9	7.7	4.1	6.5
317.33	4.1	5.3	7.1	4.1	5.9
336.00	3.5	4.7	6.5	3	5.3
354.67	4.7	5.9	7.7	4.1	6.5
373.33	3	4.1	5.9	2.4	4.7
392.00	4.7	6.5	7.7	4.7	6.5
410.67	4.1	5.9	7.7	4.7	6.5
429.33	4.1	5.3	7.1	4.1	5.9
448.00	4.1	5.3	7.1	3.5	5.3
466.67	4.7	5.3	7.1	3.5	5.9
485.33	3.5	4.7	6.5	3.5	5.3
504.00	4.1	5.3	7.1	3.5	5.3
522.67	5.9	7.1	8.9	5.3	7.7
541.33	6.5	7.7	9.4	5.9	7.7
560.00	7.1	8.3	10	6.5	8.9
578.67	6.5	7.7	9.4	5.9	7.7
597.33	4.7	5.3	7.7	3.5	5.9
616.00	3.5	4.7	5.9	3	4.7
634.67	5.9	7.1	8.9	5.3	7.1
653.33	7.1	8.3	10	7.1	8.9
672.00	8.3	8.9	10.6	7.1	9.4

Tabla IV.5- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo AKYPO RLM-25

Tensioactivo:	AKYPO RLM-25				
Ensayo de Biodegradación:	Botellas Respirométricas				
Método de Análisis:	DBO				
EXPERIMENTO: BR-2	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L
0.00	0	0	0	0	0
18.67	30.4	13.8	16.6	11.1	-5.5
37.33	33.2	27.6	52.5	38.7	8.3
56.00	33.2	24.9	69.1	52.5	5.5
74.67	35.9	22.1	77.4	60.8	8.3
93.33	35.9	16.6	82.9	63.6	0
112.00	35.9	16.6	82.9	66.3	-8.3
130.67	35.9	16.6	82.9	66.3	-5.5
149.33	35.9	13.8	85.7	60.8	-2.8
186.67	35.9	13.8	82.9	52.5	0
205.33	35.9	11.1	85.7	47	2.8
224.00	35.9	8.3	94	44.2	2.8
242.67	38.7	5.5	96.7	38.7	0
261.33	35.9	2.8	94	35.9	-8.3
280.00	38.7	2.8	94	30.4	-11.1
298.67	38.7	-2.8	88.4	27.6	-13.8
317.33	38.7	-2.8	88.4	24.9	-8.3
336.00	38.7	-2.8	85.7	22.1	-2.8
354.67	41.5	-2.8	82.9	22.1	0
373.33	41.5	-5.5	80.1	19.3	-2.8
392.00	38.7	-5.5	74.6	16.6	-8.3
410.67	41.5	-5.5	71.9	16.6	-2.8
429.33	41.5	-5.5	71.9	13.8	-11.1
448.00	44.2	-5.5	69.1	11.1	-13.8
466.67	41.5	-8.3	66.3	8.3	-11.1
485.33	41.5	-8.3	63.6	8.3	-8.3
504.00	44.2	-8.3	60.8	5.5	-5.5
522.67	44.2	-8.3	58	5.5	-11.1
541.33	41.5	-11.1	55.3	2.8	-11.1
543.20	41.5	-11.1	55.3	2.8	-11.1
560.00	41.5	-11.1	52.5	0	-11.1
578.67	41.5	-11.1	49.7	0	-5.5
597.33	47	-5.5	52.5	5.5	-5.5
616.00	49.7	-5.5	52.5	5.5	-2.8
634.67	47	-5.5	49.7	2.8	2.8
653.33	49.7	-5.5	47	5.5	0
672.00	49.7	-5.5	47	5.5	0

Tabla IV.6- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo AKYPO RLM-100

Tensioactivo:	AKYPO RLM-100				
Ensayo de Biodegradación:	Botellas Respirométricas				
Método de Análisis:	DBO				
EXPERIMENTO: BR-3	Concentración Inicial Tensioactivo				
	0 mg/L	5 mg/L	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L
Tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L
0.00	0	0	0	0	0
18.67	-2.8	0	5.5	2.8	-2.8
37.33	-2.8	8.3	27.6	33.2	30.4
56.00	0	11.1	30.4	44.2	33.2
74.67	8.3	11.1	27.6	44.2	35.9
93.33	0	11.1	27.6	41.5	33.2
112.00	-8.3	5.5	27.6	41.5	30.4
130.67	-5.5	5.5	24.9	38.7	30.4
149.33	0	11.1	27.6	35.9	30.4
168.00	2.8	11.1	38.7	33.2	30.4
186.67	2.8	11.1	44.2	49.7	27.6
205.33	2.8	11.1	47	58	24.9
224.00	2.8	11.1	44.2	60.8	22.1
242.67	0	11.1	41.5	58	22.1
261.33	-8.3	2.8	35.9	49.7	13.8
280.00	-11.1	0	33.2	49.7	11.1
298.67	-11.1	0	30.4	47	11.1
317.33	-8.3	-2.8	27.6	41.5	11.1
336.00	0	2.8	24.9	38.7	13.8
354.67	0	5.5	22.1	38.7	13.8
373.33	0	5.5	19.3	35.9	13.8
392.00	-8.3	2.8	19.3	33.2	13.8
410.67	-2.8	2.8	13.8	27.6	11.1
429.33	-8.3	0	13.8	24.9	8.3
448.00	-11.1	0	11.1	22.1	5.5
466.67	-11.1	-2.8	8.3	16.6	2.8
485.33	-8.3	-2.8	5.5	13.8	2.8
504.00	-2.8	0	5.5	13.8	5.5
522.67	-11.1	0	2.8	11.1	2.8
541.33	-11.1	-2.8	2.8	11.1	2.8
560.00	-8.3	-2.8	0	8.3	0
578.67	-2.8	-2.8	0	8.3	2.8
597.33	-5.5	0	2.8	8.3	8.3
616.00	-2.8	5.5	5.5	8.3	8.3
634.67	5.5	5.5	5.5	8.3	8.3
653.33	2.8	8.3	5.5	5.5	11.1
672.00	2.8	8.3	5.5	8.3	11.1

4.1.2 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS (APG)

Tabla IV.7- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo GLUCOPON 215

Tensioactivo:	GLUCOPON 215				
Ensayo de Biodegradación:	Botellas Respirométricas				
Método de Análisis:	DBO				
EXPERIMENTO: BR-4	Concentración Inicial Tensioactivo				
	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L	100 mg/L
Tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L
0.00	0	0	0	0	0
18.67	2.4	3	2.4	3.3	3
37.33	3	3	3	3.5	3
56.00	4.7	3	3.5	3.5	5.3
74.67	6.5	3.5	7.1	4	8.9
93.33	8.3	4.1	9.4	4.6	10.6
112.00	10.6	5.9	11.2	6.7	13
130.67	12.4	7.7	12.4	8.5	14.2
149.33	13.6	9.4	13.6	10.2	15.4
168.00	13.6	11.2	14.8	12	16.5
186.67	14.2	13.6	15.4	14.6	17.7
224.00	14.8	15.9	17.1	16.9	19.5
242.67	14.8	16.5	18.3	18.9	20.1
261.33	15.4	17.1	18.9	19.5	21.3
280.00	14.8	17.1	19.5	19.5	21.8
298.67	15.4	17.7	20.7	20.2	22.4
317.33	15.4	17.7	21.3	20.2	23
336.00	15.4	17.7	22.4	20.2	24.2
354.67	15.4	18.3	23.6	21.3	24.8
373.33	15.4	18.3	24.2	21.3	25.4
392.00	15.4	18.3	25.4	21.3	26
410.67	15.4	18.9	26.6	21.9	26.6
429.33	15.9	18.9	27.7	21.9	27.2
448.00	15.4	18.9	28.3	21.9	27.7
466.67	15.9	19.5	29.5	22.5	28.9
485.33	15.9	19.5	30.7	22.5	29.5
504.00	15.9	19.5	31.3	22.5	30.1
522.67	15.9	19.5	31.9	22.5	30.7
541.33	15.9	19.5	31.9	22.5	31.3
560.00	15.9	19.5	33.1	22.5	31.9
578.67	16.5	19.5	33.7	22.5	32.5
597.33	16.5	19.5	34.2	22.5	33.1
616.00	16.5	19.5	34.2	22.5	33.7
634.67	16.5	19.5	35.4	23.5	34.2
653.33	16.5	18.9	35.4	22.9	34.8
672.00	16.5	18.9	36	22.9	35.4

Tabla IV.8- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo GLUCOPON 600

Tensioactivo:	GLUCOPON 600				
Ensayo de Biodegradación:	Botellas Respirométricas				
Método de Análisis:	DBO				
EXPERIMENTO: BR-5	Concentración Inicial Tensioactivo				
	15 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	75 mg/L	100 mg/L
Tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L	DBO, mg O ₂ /L
0.00	0	0	0	0	0
18.67	0	0	0	0	0
37.33	0	0	0	0	0
56.00	0	0	0	13.8	19.3
74.67	0	0	11.1	24.9	30.4
93.33	5.5	16.6	27.6	27.6	38.7
112.00	11.1	24.9	35.9	30.4	44.2
130.67	16.6	30.4	44.2	35.9	47
149.33	19.3	35.9	49.7	38.7	52.5
168.00	22.1	38.7	55.3	44.2	60.8
186.67	24.9	38.7	60.8	47	69.1
205.33	24.9	41.5	66.3	52.5	80.1
224.00	27.6	44.2	71.9	58	85.7
242.67	27.6	47	77.4	63.6	91.2
261.33	30.4	52.5	82.9	69.1	96.7
280.00	30.4	52.5	85.7	74.6	99.5
298.67	33.2	55.3	88.4	80.1	105
317.33	33.2	58	91.2	82.9	111
336.00	33.2	60.8	91.2	85.7	113
354.67	35.9	63.6	94	91.2	119
373.33	35.9	63.6	96.7	94	122
392.00	35.9	66.3	99.5	99.5	124
410.67	35.9	66.3	99.5	102	127
429.33	38.7	69.1	102	105	133
448.00	38.7	69.1	102	108	135
466.67	38.7	69.1	105	113	138
485.33	38.7	69.1	108	116	141
504.00	38.7	69.1	111	119	146
522.67	38.7	69.1	111	122	146
541.33	38.7	69.1	111	124	149
560.00	41.5	69.1	111	127	152
578.67	38.7	69.1	111	130	155
597.33	41.5	69.1	113	133	158
616.00	41.5	69.1	113	135	160
634.67	41.5	69.1	116	138	163
653.33	44.2	69.1	116	141	166
672.00	44.2	71.9	119	144	169

Tabla IV.9- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para el tensioactivo GLUCOPON 650

Tensioactivo:		GLUCOPON 650							
Ensayo de Biodegradación:		Botellas Respirométricas							
Método de Análisis:		DBO							
EXPERIMENTO: BR-6									
Concentración Inicial Tensioactivo									
15 mg/L		25 mg/L		50 mg/L		75 mg/L		100 mg/L	
tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L	tiempo, h	DBO, mg O ₂ /L
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.4	0	22.4	0.2	16.8	0.2	43.4	0.2	14	0
29.4	0	30.8	0.4	31.6	0.3	50.4	0.5	28	0.6
37.8	0.6	43.4	0.9	44.8	0.8	63	1	53.2	1.2
46.2	1.2	51.8	1.2	47.6	1	68.6	1.7	68.6	2.9
57.4	2.3	60.2	1.7	56	2.1	74.2	3.4	75.6	6.3
65.8	3.4	68.6	2.3	67.2	3.2	78.4	5.1	85.4	9.1
79.8	4.6	77	3	81.2	5.1	85.4	6.3	114.8	11.4
85.4	5.1	85.4	4.6	89.6	5.7	91	7.4	142.8	13.1
91	5.7	96.6	6.3	100.8	7.4	102.2	9.1	173.6	14.8
96.6	6.3	105	8	114.8	9.7	116.2	10.9	196	15.4
105	6.9	113.4	9.1	117.6	10.3	133	12.6	215.6	16.6
107.8	7.4	121.8	9.7	134.4	12	147	13.7	235.2	17.8
121.8	8	130.2	10.3	151.2	12.5	165.2	14.3	254.8	18.3
155.4	8.5	141.4	10.3	165.2	13.7	176.4	15.4	264.6	19.5
186.2	9.1	149.8	10.3	183.4	14.8	215.6	17.2	288.4	20.6
197.4	9.1	161	10.8	200.2	16	229.6	17.8	305.2	21.7
250.6	9.8	169.4	11.4	222.6	16.5	240.8	18.9	340.2	24
264.6	9.8	177.8	12	238	17.2	260.4	19.5	362.6	25.2
340.2	10.3	186.2	12.5	268.8	17.7	278.6	20.6	375.2	25.7
358.4	10.3	194.6	12.5	296.8	18.9	296.8	21.7	399	26.9
371	10.3	205.8	13.1	310.8	19.5	313.6	22.3	420	27.5
382.2	10.3	228.2	13.7	329	20	340.2	23.5	446.6	28.6
393.4	10.3	267.4	13.8	343	20.6	358.4	24	460.6	29.2
404.6	10.3	312.2	14.3	378	21.7	376.6	24.6	473.2	29.2
432.6	10.3	326.2	14.3	399	22.3	393.4	25.2	487.2	29.8
443.8	10.3	340.2	14.3	418.6	22.9	452.2	25.8	497	30.3
455	10.3	368.2	14.3	441	23.1	466.2	25.8	505	30.2
480.2	10.3	376.6	14.3	455	23.5	484.4	26.3	520	30.3
494.2	10.3	401.8	14.3	478.8	23.5	498.4	26.3	545	30.3
550.6	10.2	424.2	14.3	510	23.4	510	26.3	575	30.3
646.6	10.2	432.6	14.3	646.6	23.5	598.6	26.2	646.6	30.3
694.6	10.3	441	14.3	694.6	23.5	694.6	26.3	694.6	30.3

4.1.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS (AEG)

Tabla IV.10- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el tensioactivo FINDET 1214N/23

Tensioactivo:	FINDET 1214N/23			
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO			
Medida de la concentración:	Método yodo-yoduro			
Medida de la Biomasa:	Recuento UFC			
EXPERIMENTO: E-4	Concentración Inicial Tensioactivo			
	50 mg/L		100 mg/L	
Tiempo, h	Conc, mg/L	UFC/ml	Conc, mg/L	UFC/ml
0	38.92	7.11E+03	89.09	1.06E+04
24	28.50	5.83E+06	89.42	1.01E+07
48	21.63	1.29E+07	88.53	1.04E+07
120	10.16	1.21E+07	77.49	1.60E+07
145	7.82	4.82E+06	74.61	6.56E+06
168	6.66	9.97E+06	69.93	1.89E+07
289.5	7.92	1.27E+07	66.85	1.77E+07
311.5	7.31	1.91E+07	62.93	9.07E+07
336	7.61	2.41E+07	62.65	2.63E+07
359.5	8.20	2.28E+07	63.20	3.40E+07
384	7.29	1.46E+07	64.70	4.26E+07
456.5	6.00	5.33E+07	60.19	2.02E+07
480	7.74	1.07E+07	61.10	1.75E+07
506	11.08	1.46E+07	59.94	3.60E+07
600	8.97	2.44E+07	61.94	4.50E+07
623	10.34	4.34E+07	61.23	3.92E+07
649	11.09	1.02E+07	59.06	5.72E+07
669.5	8.59	3.30E+06	59.08	4.48E+07
695.5	8.21	3.24E+07	56.20	4.84E+07
790	8.79	2.21E+07	57.28	5.01E+07
815.5	8.30	4.93E+07	54.71	9.45E+07
839.5	8.81	4.82E+07	44.28	3.48E+07
886	8.49	1.45E+08	46.87	5.60E+07
959.5	7.33	6.31E+07	47.79	1.76E+07
1008	9.49	6.10E+07	42.30	9.85E+07
1054.5	10.45	1.38E+08	47.55	1.14E+08
1296.5	10.66	1.35E+08	41.71	2.46E+08
1366.5	9.22	1.48E+08	44.56	1.18E+08

Tabla IV.11- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para el tensioactivo FINDET 1618A/18

Tensioactivo:	FINDET 1618A/18	
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO	
Medida de la concentración:	Método yodo-yoduro	
Medida de la Biomasa:	Recuento UFC	
EXPERIMENTO: E-5	Concentración Inicial Tensioactivo, 50 mg/L	
Tiempo, h	Conc, mg/L	UFC/ml
0	28.33	3.07E+04
24	32.54	8.20E+05
48	16.25	3.38E+06
120	4.68	5.82E+06
145	2.63	3.23E+06
168	1.04	2.79E+06
289.5	4.34	2.23E+06
311.5	0.26	3.53E+06
336	0.35	1.06E+07
359.5	0.17	4.65E+06
384	0.06	1.04E+07
456.5	0.11	2.44E+06
480	0.17	9.84E+06
506	1.14	8.38E+06
600	2.14	1.07E+07
623	1.24	7.43E+06
649	1.23	8.91E+06
669.5	0.77	8.90E+06
695.5	1.20	1.24E+07
790	1.26	7.56E+06
815.5	1.37	6.96E+06
839.5	0.51	7.50E+06
886	0.71	1.08E+07
959.5	0.25	1.27E+07
1008	0.64	7.55E+06
1054.5	-0.54	1.37E+07
1296.5	-0.82	2.98E+08
1366.5	0.33	8.29E+07

4.1.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL (LAS)

Tabla IV.12- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para LAS

Tensioactivo:	LAS
Ensayo de Biodegradación:	ESTÁTICO
Medida de la concentración:	Método sustancias activas al azul de metileno
EXPERIMENTO: E-6	Concentración Inicial Tensioactivo, 5 mg/L
Tiempo, h	Conc, mg/L
0	4.38
24	3.89
48	3.91
120	0.28
145	0.06
168	0.07
289.5	0.06
311.5	-0.08
336	0.05
359.5	-0.06

4.2 TOXICIDAD DE TENSOACTIVOS

En las Tabla IV.13 a IV.60 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con bacterias luminiscentes, microcrustáceos *Daphnia magna*, y microalgas *Selenastrum capricornutum*, para los tensioactivos ensayados.

En estas tablas se indica el tensioactivo ensayado, el método de medida, el organismo de prueba utilizado, y las condiciones en las que se lleva a cabo el experimento.

4.2.1 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

Tabla IV.13- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO LF1

Tensioactivo:		AKYPO LF1							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO:	B-1	Tiempo incubación 15 min				Tiempo Incubación 30 min			
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	773.8	831.8	0.00	0.000	773.8	860.0	0.00	0.000	
0.98	784.5	829.8	1.60	0.016	784.5	846.4	2.92	0.030	
1.95	783.7	783.9	6.95	0.075	783.7	799.6	8.20	0.089	
3.91	784.2	764.7	9.29	0.102	784.2	784.5	9.99	0.111	
7.81	736.8	665.7	15.95	0.190	736.8	695.5	15.07	0.177	
15.63	755.5	570.0	29.81	0.425	755.5	603.2	28.16	0.392	
31.25	737.3	389.2	50.89	1.036	737.3	447.2	45.43	0.832	
62.50	691.2	251.2	66.19	1.958	691.2	294.5	61.66	1.608	
125.00	724.3	158.4	79.66	3.915	724.3	199.3	75.24	3.039	
250.00	740.0	54.5	93.15	13.590	740.0	68.4	91.68	11.026	
		$f_c=1.075$				$f_c= 1.111$			

Tabla IV.14- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO LF2

Tensioactivo:		AKYPO LF2							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO:		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
B-2									
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	379.3	387.7	0.00	0.000	379.3	340.5	0.00	0.000	
0.98	368.8	337.7	10.42	0.116	368.8	302.9	8.51	0.093	
1.95	394.0	382.2	5.10	0.054	394.0	349.5	1.19	0.012	
3.91	388.7	339.9	14.45	0.169	388.7	320.3	8.21	0.089	
7.81	403.2	345.9	16.07	0.191	403.2	328.5	9.24	0.102	
15.63	398.7	343.3	15.76	0.187	398.7	314.9	12.02	0.137	
31.25	390.2	310.5	22.15	0.285	390.2	287.6	17.90	0.218	
62.50	393.7	280.1	30.40	0.437	393.7	272.7	22.84	0.296	
125.00	415.9	228.5	46.25	0.860	415.9	218.6	41.45	0.708	
250.00	414.5	137.0	67.66	2.093	414.5	133.0	64.26	1.798	
			<i>fc=1.022</i>				<i>fc= 0.897</i>		

Tabla IV.15- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO LF4

Tensioactivo:		AKYPO LF4							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO:		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
B-3									
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	484.4	583.1	0.00	0.000	498.8	632.4	0.00	0.000	
0.98	479.0	579.7	-0.54	-0.005	507.2	603.4	6.17	0.066	
1.95	480.1	560.2	3.07	0.032	503.4	613.4	3.89	0.040	
3.91	485.3	550.2	5.82	0.062	504.0	601.6	5.85	0.062	
7.81	479.1	510.8	11.43	0.129	507.9	563.2	12.54	0.143	
15.63	489.6	486.8	17.40	0.211	510.9	540.0	16.63	0.200	
31.25	485.6	417.3	28.61	0.401	511.2	463.9	28.42	0.397	
62.50	466.2	319.8	43.01	0.755	503.4	380.2	40.43	0.679	
125.00	482.3	221.8	61.80	1.618	516.5	282.6	56.84	1.317	
250.00	507.7	102.0	83.31	4.992	532.4	138.6	79.47	3.870	
			<i>fc=1.203</i>				<i>fc= 1.267</i>		

Tabla IV.16- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO LF6

Tensioactivo:		AKYPO LF6							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO: B-4	<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>				
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	631.5	632.6	0.00	0.000	631.5	675.6	0.00	0.000	
0.98	609.3	614.3	-0.65	-0.006	609.3	674.1	-3.41	-0.033	
1.95	622.8	628.8	-0.79	-0.008	622.8	688.3	-3.30	-0.032	
3.91	628.3	609.5	3.16	0.033	628.3	633.4	5.77	0.061	
7.81	669.6	661.0	1.46	0.015	669.6	711.6	0.66	0.007	
15.63	682.8	637.2	6.84	0.073	682.8	695.9	4.73	0.050	
31.25	662.4	583.0	12.14	0.138	662.4	633.7	10.58	0.118	
62.50	656.6	525.9	20.04	0.251	656.6	594.8	15.33	0.181	
125.00	656.8	430.1	34.63	0.530	656.8	501.9	28.57	0.400	
250.00	681.2	258.6	62.10	1.639	681.2	263.7	63.82	1.764	
				<i>fc=1.002</i>					<i>fc= 1.069</i>

Tabla IV.17- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO RLM-25

Tensioactivo:		AKYPO RLM-25							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO: B-5	<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>				
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	181.4	223.7	0.00	0.000	183.8	184.3	0.00	0.000	
0.98	189.3	183.5	21.39	0.272	176.9	160.4	9.57	0.106	
1.95	179.0	117.6	46.72	0.877	184.9	130.7	29.50	0.419	
3.91	194.8	85.0	64.62	1.827	194.4	92.3	52.64	1.111	
7.81	197.8	49.7	79.62	3.906	185.3	57.8	68.92	2.217	
15.63	191.9	26.6	88.75	7.890	191.2	34.9	81.81	4.498	
31.25	188.4	8.1	96.50	27.577	193.5	11.2	94.25	16.401	
62.50	195.8	1.1	99.56	226.790	197.1	0.5	99.76	410.742	
125.00	193.6	0.8	99.68	313.138	190.1	0.1	99.94	1731.883	
250.00	204.8	0.1	99.95	2103.638	198.6	0.1	99.97	3981.805	
				<i>fc=1.122</i>					<i>fc= 1.003</i>

Tabla IV.18- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para AKYPO RLM-100

Tensioactivo:		AKYPO RLM-100							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO: B-6		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	517.6	679.5	0.00	0.000	517.6	681.6	0.00	0.000	
0.98	489.2	633.2	1.40	0.014	489.2	603.5	6.32	0.067	
1.95	502.6	613.2	7.06	0.076	502.6	582.7	11.96	0.136	
3.91	517.7	549.5	19.15	0.237	517.7	569.0	16.54	0.198	
7.81	516.9	380.0	44.00	0.786	516.9	405.3	40.46	0.679	
15.63	519.8	239.4	64.92	1.850	519.8	256.9	62.47	1.664	
31.25	534.0	134.1	80.87	4.228	534.0	163.9	76.69	3.290	
62.50	511.7	85.0	87.35	6.908	511.7	100.4	85.10	5.711	
125.00	525.1	44.0	93.62	14.678	525.1	49.3	92.87	13.017	
250.00	545.8	20.7	97.11	33.564	545.8	21.0	97.09	33.307	
<i>fc=1.313</i>				<i>fc= 1.317</i>					

Tabla IV.19- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO LF1

Tensioactivo:		AKYPO LF1	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-1		<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados		% Efecto
40	12		60
60	14		70
80	16		80
100	17		85
120	18		90
150	20		100

Tabla IV.20- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO LF2

Tensioactivo:	AKYPO LF2	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-2	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
40	0	0
60	1	5
80	3	15
120	10	50
150	13	65

Tabla IV.21- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO LF4

Tensioactivo:	AKYPO LF4	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-3	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
40	0	0
60	4	20
80	12	60
100	14	70
120	17	85
150	20	100

Tabla IV.22- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO LF6

Tensioactivo:	AKYPO LF6	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-4	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
500	12	60
600	13	65
700	14	70
800	16	80
1000	17	85
1250	18	90

Tabla IV.23- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO RLM-25

Tensioactivo:	AKYPO RLM-25	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-5	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
1	1	5
3	10	50
5	15	75
10	16	80
15	19	95
20	20	100

Tabla IV.24- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo AKYPO RLM-100

Tensioactivo:	AKYPO RLM-100	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-6	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
5	0	0
10	1	5
15	6	30
20	13	65
25	15	75
50	17	85

Tabla IV.25- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO LF1

Tensioactivo:	AKYPO LF1	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-1	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0253	0
150	0.0050	80.10
100	0.0111	56.17
50	0.0180	28.83
25	0.0245	3.27
15	0.0252	0.30

Tabla IV.26- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO LF2

Tensioactivo:	AKYPO LF2	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-2	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0454	0
500	0.0131	71.22
250	0.0151	66.73
125	0.0201	55.63
62.5	0.0238	47.50

Tabla IV.27- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO LF4

Tensioactivo:	AKYPO LF4	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-3	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0202	0
500	0.0061	69.76
400	0.0075	63.04
300	0.0120	40.54
200	0.0150	26.12
150	0.0189	6.50

Tabla IV.28- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO LF6

Tensioactivo:	AKYPO LF6	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-4	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0181	0
1000	0.0023	87.21834003
800	0.0111	38.52019387
600	0.0136	24.83547938
400	0.0177	2.514064345

Tabla IV.29- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO RLM-25

Tensioactivo:	AKYPO RLM-25		
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento		
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>		
Condiciones:	pH neutro		
EXPERIMENTO: A-5	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>		
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición	
CONTROL	0.0220	0	
20	0.0067	69.53	
10	0.0072	67.31	
5	0.0145	34.43	
2.5	0.0158	28.33	
1.25	0.0207	6.29	

Tabla IV.30- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con el tensioactivo AKYPO RLM-100

Tensioactivo:	AKYPO RLM-100		
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento		
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>		
Condiciones:	pH neutro		
EXPERIMENTO: A-6	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>		
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición	
CONTROL	0.0235	0.00	
50	0.0092	60.85	
25	0.0114	51.29	
12.5	0.0144	38.50	
6.25	0.0228	3.02	
3.125	0.0273	0.00	

4.2.2 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

Tabla IV.31- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para mezcla de AKYPO LF2 y AKYPO RLM-100 (1:1)

Tensioactivo:		MEZCLA AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO:		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
B-7									
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	426.8	455.2	0.00	0.000	426.8	446.3	0.00	0.000	
0.98	414.1	427.9	3.11	0.032	414.1	415.8	3.98	0.041	
1.95	413.7	447.9	-1.51	-0.015	413.7	433.0	-0.09	-0.001	
3.91	424.7	433.5	4.30	0.045	424.7	410.4	7.59	0.082	
7.81	441.0	414.8	11.81	0.134	441.0	391.4	15.13	0.178	
15.63	442.0	396.6	15.87	0.189	442.0	369.7	20.01	0.250	
31.25	407.8	304.2	30.06	0.430	407.8	298.1	30.09	0.430	
62.50	437.3	216.3	53.62	1.156	437.3	223.9	51.04	1.042	
125.00	469.2	120.6	75.90	3.149	469.2	123.7	74.79	2.966	
250.00	447.6	58.2	87.81	7.202	447.6	62.4	86.68	6.506	
				<i>fc=1.066</i>				<i>fc= 1.045</i>	

Tabla IV.32- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para mezcla de AKYPO LF2 y AKYPO RLM-25 (1:1)

Tensioactivo:		MEZCLA AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25 (1:1)							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro							
EXPERIMENTO:		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
B-8									
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	132.4	168.2	0.00	0.000	132.4	156.8	0.00	0.000	
0.98	121.2	152.7	0.83	0.008	121.2	145.0	-1.02	-0.010	
1.95	125.3	137.3	13.75	0.159	125.3	127.4	14.15	0.165	
3.91	132.1	143.3	14.61	0.171	132.1	135.5	13.39	0.155	
7.81	127.3	105.1	35.01	0.539	127.3	101.6	32.61	0.484	
15.63	135.2	70.7	58.84	1.429	135.2	80.3	49.82	0.993	
31.25	128.8	38.9	76.20	3.202	128.8	44.7	70.68	2.410	
62.50	126.2	19.6	87.77	7.176	126.2	25.1	83.21	4.954	
125.00	131.8	2.8	98.36	59.886	131.8	2.9	98.12	52.273	
250.00	143.6	0.6	99.67	298.063	143.6	0.3	99.81	530.450	
				<i>fc=1.270</i>				<i>fc= 1.184</i>	

Tabla IV.33- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para mezcla de AKYPO RLM-100 y AKYPO RLM-25 (1:1)

Tensioactivo:		MEZCLA AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25 (1:1)						
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox						
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>						
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L pH neutro						
EXPERIMENTO: B-9	<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
	Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %
CONTROL	374.7	490.2	0.00	0.000	374.7	457.4	0.00	0.000
0.98	364.8	444.2	6.92	0.074	364.8	392.0	11.97	0.136
1.95	366.3	447.1	6.70	0.072	366.3	416.5	6.85	0.074
3.91	388.8	418.5	17.72	0.215	388.8	387.0	18.46	0.226
7.81	386.4	355.0	29.77	0.424	386.4	329.4	30.16	0.432
15.63	385.8	251.1	50.25	1.010	385.8	261.3	44.52	0.802
31.25	380.2	153.6	69.12	2.238	380.2	169.1	63.56	1.745
62.50	397.9	76.9	85.22	5.766	397.9	87.6	81.96	4.542
125.00	410.9	14.7	97.27	35.643	410.9	17.1	96.59	28.316
250.00	418.3	1.4	99.74	384.380	418.3	0.5	99.91	1085.432
<i>fc=1.308</i>					<i>fc= 1.220</i>			

Tabla IV.34- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para mezcla de AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)

Tensioactivo:		MEZCLA AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-7	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>		
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados		% Efecto
50	11		55
60	13		65
80	7		85
100	18		90
200	20		100

Tabla IV.35- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para mezcla de AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25 (1:1)

Tensioactivo:	MEZCLA AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-8	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
2.5	0	0
5	9	45
10	16	80
20	17	85
30	17	85
40	18	90

Tabla IV.36- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para mezcla de AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25 (1:1)

Tensioactivo:	MEZCLA AKYPO 100 + AKYPO RLM-25 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-9	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
2	0	0
3	10	20
5	13	35
7.5	16	80
10	17	85
15	18	90

Tabla IV.37- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivo AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)

Tensioactivo:	AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-7	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0200	0.00
275	0.0089	55.49
137.5	0.0109	45.57
68.75	0.0116	42.26
34.375	0.0158	21.00
17.1875	0.0164	17.93

Tabla IV.38- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivo AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25(1:1)

Tensioactivo:	AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-8	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0198	0.00
150	0.0070	64.58
100	0.0076	61.78
50	0.0114	42.26
25	0.0191	3.43
15	0.0197	0.37

Tabla IV.39- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivo AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25(1:1)

Tensioactivo:	AKYPO RLM-100+ AKYPO RLM-25 (1:1)	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: A-9	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0253	0.00
75	0.0080	68.43
50	0.0063	75.05
25	0.0155	38.99
15	0.0168	33.82
5	0.0242	4.52

4.2.3 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS

Tabla IV.40- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para GLUCOPON 215

Tensioactivo:		GLUCOPON 215						
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox						
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>						
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L						
EXPERIMENTO: B-10	Tiempo incubación 15 min				Tiempo Incubación 30 min			
	Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %
CONTROL	25.52	29.94	0.00	0.000	25.5	27.4	0.00	0.000
0.98	24.90	28.56	2.23	0.023	24.9	26.1	2.34	0.024
1.95	24.50	29.16	-1.45	-0.014	24.5	24.6	6.37	0.068
3.91	26.73	30.52	2.68	0.028	26.7	24.3	15.44	0.183
7.81	27.27	26.06	18.54	0.228	27.3	22.4	23.37	0.305
15.63	27.40	23.09	28.17	0.392	27.4	17.2	41.35	0.705
31.25	26.52	17.38	44.14	0.790	26.5	13.8	51.50	1.062
62.50	25.16	12.64	57.18	1.335	25.2	10.2	62.07	1.636
125.00	27.95	7.28	77.80	3.504	28.0	5.2	82.79	4.811
250.00	29.78	4.18	88.04	7.358	29.8	3.1	90.45	9.476
$fc=1.173$					$fc= 1.073$			

Tabla IV.41- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para GLUCOPON 600

Tensioactivo:		GLUCOPON 600						
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox						
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>						
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L						
EXPERIMENTO: B-11	Tiempo incubación 15 min				Tiempo Incubación 30 min			
	Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %
CONTROL	111.2	147.3	0.00	0.000	111.2	138.2	0.00	0.000
0.98	111.1	146.3	0.59	0.006	111.1	132.6	3.97	0.041
1.95	110.1	124.6	14.57	0.170	110.1	107.4	21.51	0.274
3.91	115.0	127.5	16.30	0.195	115.0	116.9	18.21	0.223
7.81	96.0	85.5	32.78	0.488	96.0	78.6	34.10	0.518
15.63	112.7	72.5	51.43	1.059	112.7	71.4	49.04	0.962
31.25	104.3	47.5	65.60	1.907	104.3	46.7	63.98	1.776
62.50	115.7	31.1	79.69	3.923	115.7	32.1	77.66	3.477
125.00	126.3	5.4	96.77	29.925	126.3	4.5	97.11	33.650
250.00	118.8	-0.1	100.00	-2249.10	118.8	-0.1	100.00	-1846.56
$fc=1.324$					$fc= 1.243$			

Tabla IV.42- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para GLUCOPON 650

Tensioactivo:		GLUCOPON 650						
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox						
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>						
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L						
EXPERIMENTO: B-12	<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}
CONTROL	173.6	224.9	0.00	0.000	173.6	209.8	0.00	0.000
0.98	169.9	217.1	1.37	0.014	169.9	197.9	3.62	0.038
1.95	173.3	212.0	5.57	0.059	173.3	181.2	13.48	0.156
3.91	174.4	201.8	10.68	0.120	174.4	183.4	12.98	0.149
7.81	178.9	176.4	23.89	0.314	178.9	170.2	21.28	0.270
15.63	182.5	131.5	44.38	0.798	182.5	128.9	41.56	0.711
31.25	177.4	84.4	63.28	1.723	177.4	87.6	59.16	1.449
62.50	177.0	44.7	80.52	4.133	177.0	44.2	79.34	3.840
125.00	179.4	2.4	98.98	97.065	179.4	2.7	98.75	78.709
250.00	187.3	0.1	99.96	2425.48	187.3	0.3	99.86	729.183
<i>fc=1.324</i>				<i>fc= 1.208</i>				

Tabla IV.43- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo GLUCOPON 215

Tensioactivo:		GLUCOPON 215	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-10	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>		
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados		% Efecto
70	0		0
85	1		5
100	3		15
115	6		30
130	13		65
150	14		70

Tabla IV.44- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo GLUCOPON 600

Tensioactivo:		GLUCOPON 600	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-11	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>		
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados		% Efecto
5	0		0
10	1		5
20	9		45
35	12		60
50	18		90

Tabla IV.45- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo GLUCOPON 650

Tensioactivo:	GLUCOPON 650	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-12	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
20	0	0
30	5	25
40	10	50
50	14	70
60	17	85

Tabla IV.46- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 215

Tensioactivo:	GLUCOPON 215	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-10	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0222	0.00
2500	0.0040	81.76
1250	0.0119	46.42
625	0.0132	40.26
312.5	0.0176	20.56

Tabla IV.47- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 600

Tensioactivo:	GLUCOPON 600	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-11	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0223	0
90	0.0066	70.53
70	0.0074	66.81
50	0.0088	60.39
30	0.0132	40.92
10	0.0223	0.01

Tabla IV.48- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 650

Tensioactivo:	GLUCOPON 650	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-12	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0215	0.00
90	0.0121	43.76
70	0.0135	36.89
50	0.0139	35.35
30	0.0154	28.01
10	0.0215	0.00

4.2.4 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA

Tabla IV.49- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para OXIDET DM-4

Tensioactivo:		OXIDET DM-4							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L							
EXPERIMENTO: B-13	Tiempo incubación 15 min				Tiempo Incubación 30 min				
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	345.9	450.3	0.00	0.000	345.9	520.4	0.00	0.000	
0.98	372.2	399.2	17.61	0.214	372.2	468.5	16.33	0.195	
1.95	359.4	319.8	31.65	0.463	359.4	375.1	30.63	0.442	
3.91	365.5	211.1	55.63	1.254	365.5	274.9	50.01	1.000	
7.81	363.4	132.1	72.08	2.581	363.4	180.3	67.02	2.032	
15.63	368.4	75.8	84.19	5.327	368.4	96.7	82.55	4.732	
31.25	367.6	19.9	95.85	23.108	367.6	25.9	95.32	20.353	
62.50	358.2	0.5	99.90	970.484	358.2	0.3	99.95	1994.945	
125.00	388.8	0.3	99.93	1532.782	388.8	0.4	99.94	1538.322	
250.00	393.2	0.2	99.96	2842.756	393.2	0.5	99.92	1206.269	
				$f_c=1.302$					$f_c=1.504$

Tabla IV.50- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para OXIDET DM-20

Tensioactivo:		OXIDET DM-20							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L							
EXPERIMENTO: B-14	Tiempo incubación 15 min				Tiempo Incubación 30 min				
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	601.4	647.6	0.00	0.000	601.4	679.2	0.00	0.000	
0.98	599.5	205.6	68.15	2.140	599.5	200.2	70.43	2.382	
1.95	580.8	119.7	80.86	4.225	580.8	106.5	83.76	5.159	
3.91	648.6	68.8	90.15	9.156	648.6	60.1	91.79	11.184	
7.81	606.0	38.6	94.09	15.914	606.0	35.1	94.87	18.510	
15.63	599.9	24.0	96.29	25.972	599.9	20.6	96.96	31.921	
31.25	580.1	17.7	97.16	34.232	580.1	14.3	97.82	44.814	
62.50	617.8	10.6	98.41	61.998	617.8	8.9	98.72	77.308	
125.00	609.7	4.1	99.37	158.354	609.7	4.0	99.41	169.439	
250.00	621.6	0.8	99.89	879.726	621.6	0.9	99.87	753.853	
				$f_c=1.077$					$f_c=1.129$

Tabla IV.51- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias *Vibrio Fischeri* para OXIDET L75C

Tensioactivo:		OXIDET L75C							
Medida de la Toxicidad:		Determinación de la Inhibición mediante LUMISTox							
Organismo de prueba:		<i>Photobacterium phosphoreum</i> de la cepa <i>Vibrio Fischeri</i>							
Condiciones:		Concentración Inicial Tensioactivo, 250 mg/L							
EXPERIMENTO: B-15		<i>Tiempo incubación 15 min</i>				<i>Tiempo Incubación 30 min</i>			
Concentración, mg/L	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	Intens, I_o	Intens, I_t	Inhib. %	Γ_{tc}	
CONTROL	905.2	1105.0	0.00	0.000	905.2	1183.0	0.00	0.000	
0.98	880.8	1040.0	3.28	0.034	880.8	1140.0	0.97	0.010	
1.95	927.8	1075.0	5.08	0.054	927.8	1118.0	7.80	0.085	
3.91	905.2	913.6	17.32	0.210	905.2	1003.0	15.22	0.179	
7.81	903.1	988.0	10.38	0.116	903.1	1066.0	9.68	0.107	
15.63	913.0	939.5	15.70	0.186	913.0	1009.0	15.44	0.183	
31.25	854.1	790.0	24.23	0.320	854.1	836.2	25.09	0.335	
62.50	891.1	667.2	38.66	0.630	891.1	715.5	38.56	0.628	
125.00	896.8	458.7	58.10	1.387	896.8	479.4	59.10	1.445	
250.00	899.8	235.2	78.59	3.670	899.8	239.0	79.68	3.920	
				<i>fc=1.221</i>					<i>fc= 1.307</i>

Tabla IV.52- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo OXIDET DM-4

Tensioactivo:		OXIDET DM-4	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-13		<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto	
3	0	0	
5	0	0	
10	1	5	
15	10	50	
20	13	65	

Tabla IV.53- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo OXIDET DM-20

Tensioactivo:		OXIDET DM-20	
Medida de la Toxicidad:		Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:		<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:		pH neutro	
EXPERIMENTO: D-14		<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto	
15	3	15	
20	6	30	
25	8	40	
30	11	55	
40	13	75	
50	19	95	

Tabla IV.54- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo OXIDET L75C

Tensioactivo:	OXIDET L75C	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-15	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
50	0	0
70	49	45
80	13	65
90	17	85

Tabla IV.55- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con OXIDET DM-4

Tensioactivo:	OXIDET DM-4	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-13	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0162	0.00
200	0.0028	82.43
100	0.0069	57.20
50	0.0096	40.38
25	0.0098	39.47

Tabla IV.56- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con OXIDET DM-20

Tensioactivo:	OXIDET DM-20	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-14	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0150	0.00
60	0.0150	38.84
15	0.0206	15.84
7.5	0.0226	7.96
3.75	0.0229	6.55

4.2.5 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS

Tabla IV.57- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo LEVENOL C-201

Tensioactivo:	LEVENOL C-201	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-13	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
10	0	0
20	1	5
40	4	20
60	6	30
80	9	45
100	12	60

Tabla IV.58- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo LEVENOL C-421

Tensioactivo:	LEVENOL C-421	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-14	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
10	2	10
20	5	25
40	11	55
80	12	60
100	13	65

4.2.6 TOXICIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL (LAS)

Tabla IV.59- Medida de la muerte o inmovilización de *Daphnia magna* para el tensioactivo LAS

Tensioactivo:	LAS	
Medida de la Toxicidad:	Determinación del número de microcrustáceos inmovilizados	
Organismo de prueba:	<i>Daphnia magna</i>	
Condiciones:	pH neutro	
EXPERIMENTO: D-17	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 24 h</i>	
Concentración, mg/L	Nº Inmovilizados	% Efecto
5	0	0
7.5	3	15
10	8	40
15	16	80
20	100	100

Tabla IV.60- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con LAS

Tensioactivo:	LAS	
Medida de la Toxicidad:	Determinación de la inhibición del crecimiento	
Organismo de prueba:	Microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	
EXPERIMENTO: A-14	<i>Tiempo de exposición con el tóxico 72 h</i>	
Concentración, mg/L	Tasa de Crecimiento, h⁻¹	% Inhibición
CONTROL	0.0226	0.00
100	0.0133	41.37
50	0.0144	36.20
25	0.0184	18.52
12.5	0.0203	10.18
6.25	0.0226	0.24

V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 BIODEGRADABILIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

El enorme uso de tensioactivos en detergentes y formulaciones cosméticas, y su posterior vertido en los sistemas acuáticos, requiere que dichos tensioactivos sean tan respetuosos como sea posible con el medio ambiente, esto implica la necesidad de que presenten baja toxicidad y que sean fácilmente biodegradables. El impacto medioambiental de los productos químicos a menudo está determinado por la ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en el caso de tensioactivos como consecuencia de su actividad superficial y la correspondiente acción a través de las membranas biológicas. Ésta creciente preocupación impulsa el desarrollo de nuevos tensioactivos, tales como los ácidos alquil éter carboxílicos.

Los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados en este estudio son tensioactivos aniónicos que pertenecen a la Serie AKYPO® de Kao-Corporation. Éstos mejoran la calidad del detergente reduciendo el nivel de irritación, por eso son utilizados como tensioactivos en detergentes que van a estar en contacto con la piel y ojos.

La biodegradación es el principal mecanismo de eliminación de los compuestos orgánicos en el medio ambiente. El conocimiento de la biodegradabilidad y toxicidad de tensioactivos es una necesidad para la decisión de su inclusión en formulaciones detergentes. Al tratarse de una nueva clase de tensioactivos, son muy escasos los estudios encaminados a conocer la biodegradabilidad de los ácidos alquil éter carboxílicos.

Los Tensioactivos AKYPO® para los que se ha analizado la biodegradabilidad han sido: AKYPO® LF2, AKYPO® RLM-25, AKYPO® RLM-100. Las principales propiedades se muestran en la Tabla V.1, donde se indican la longitud de la cadena (R), el grado de etoxilación (n), el tanto por ciento de materia activa y la concentración micelar crítica (CMC).

Tabla V.1: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	R	n	% Materia Activa	CMC, mg/L
AKYPO® RLM 25	Laureth-4 Carboxylic Acid	C12-C14	≈3	≈ 94	23.3
AKYPO® RLM 100	Laureth-11 Carboxylic Acid	C12-C14	10	≈ 90	41.8
AKYPO® LF2	Capryleth-9 Carboxylic Acid	C8	8	≈ 89	257.8

Para el estudio de la biodegradabilidad se han seleccionado dos tipos de ensayos, el ensayo estático (apartado 3.2.1) y el método respirométrico (apartado 3.2.2). En el primero se sigue la evolución de la biodegradación final mediante la medida del carbono orgánico total (apartado 3.3.1.3), con el equipo Shimadzu TOC-V CSH. En el segundo se mide la DBO

utilizando las botellas OxiTop Control (apartado 3.2.2). La DBO tiene la ventaja de que es un parámetro biológico que mide directamente la degradación aerobia, (Reusschenbach, 2003). Este último método se utiliza para determinar también la biodegradabilidad final o mineralización de los AKYPO®.

5.1.1 BIODEGRADABILIDAD ÚLTIMA

A continuación se presentan los perfiles de biodegradación final obtenidos para los tensioactivos ensayados. La evolución de la concentración se expresa como TOC residual y como porcentaje de biodegradación final alcanzado.

La concentración de carbono orgánico total residual y la biodegradación final se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\% TOC_{residual} = \frac{[TOC]_t}{[TOC]_0} \cdot 100$$

Ecuación V.1

$$\% Biodegradación\ final = \frac{[TOC]_0 - [TOC]_t}{[TOC]_0} \cdot 100$$

Ecuación V.2

donde:

$[TOC]_t$ = Concentración carbono orgánico total en un instante t

$[TOC]_0$ = Concentración carbono orgánico total al comienzo del ensayo

Todos los perfiles de biodegradación final obtenidos presentan tres fases bien diferenciadas:

1. Fase de aclimatación de los microorganismos, caracterizada porque la concentración se mantiene prácticamente constante o experimenta un ligero aumento. En esta primera etapa, y debido a la acumulación y adsorción del tensioactivo en las interfases, se observan algunas variaciones de la concentración de tensioactivo residual.
2. Disminución rápida de la concentración debido a la metabolización por parte de los microorganismos.
3. Período donde la concentración residual permanece prácticamente constante.

Para todos los tensioactivos a concentraciones de entre 5 mg/L y 25 mg/L, el porcentaje de biodegradación final alcanzado es superior al 60 %. La legislación vigente (Reglamento CE nº 648, 2004) exige que se alcance un nivel mínimo del 60 % de biodegradación final antes de 28 días cuando se aplica uno de los métodos recogidos en el Anexo III del Reglamento (CE) nº 648/2004. Si cumple con esta condición el tensioactivo puede considerarse como biodegradable.

Para analizar la influencia del grado de etoxilación y del tamaño de la cadena carbonada sobre el proceso de biodegradación final, se comparan los resultados obtenidos para diferentes tensioactivos a las concentraciones iniciales de 5 mg/L, 15mg/L, 25 mg/L y 50 mg/L (Figura V.1, Figura V.2). Con el fin de poder comparar los distintos tensioactivos, la evolución de la desaparición de tensioactivo se ha seguido mediante el % de TOC residual.

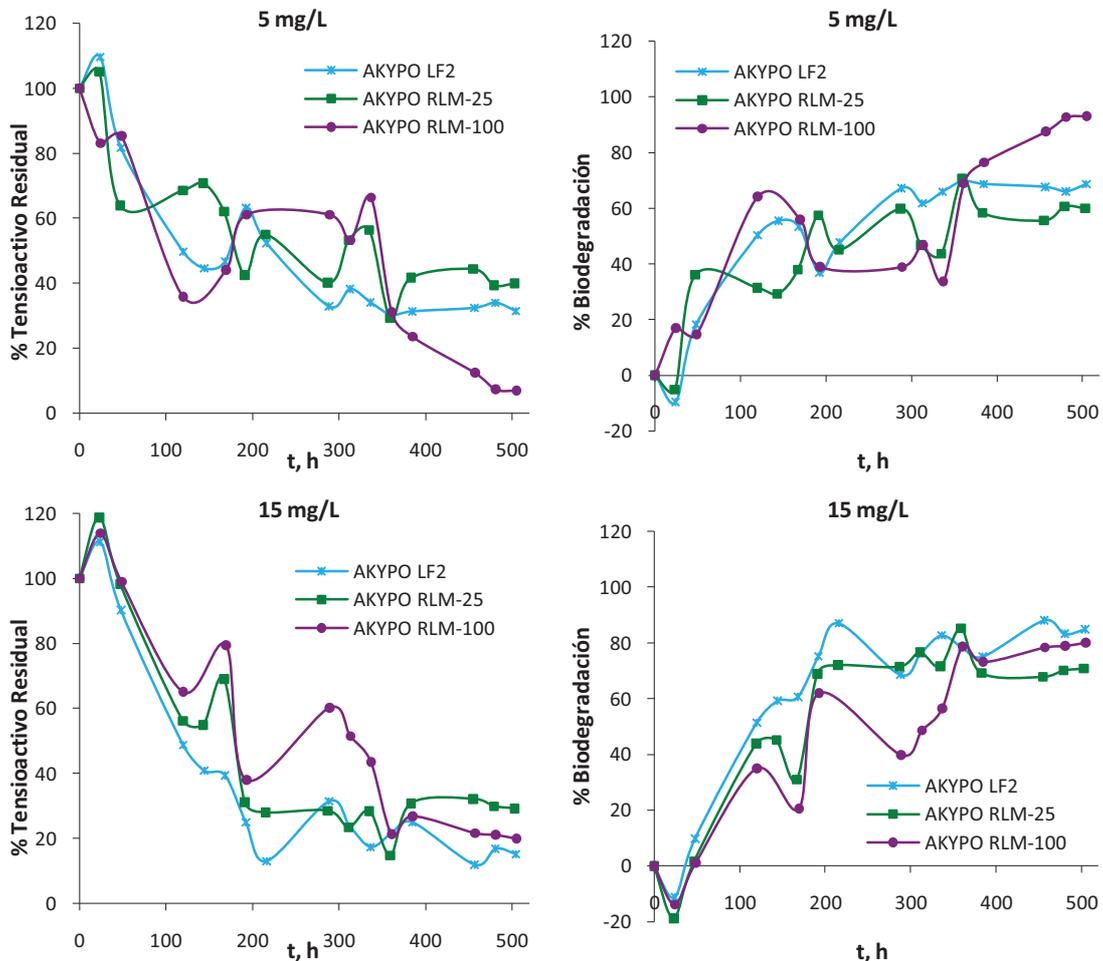


Figura V.1.- Variación del TOC residual y del porcentaje de biodegradación final con el tiempo para los AKYPO ensayados a 5 mg/L y 15 mg/L

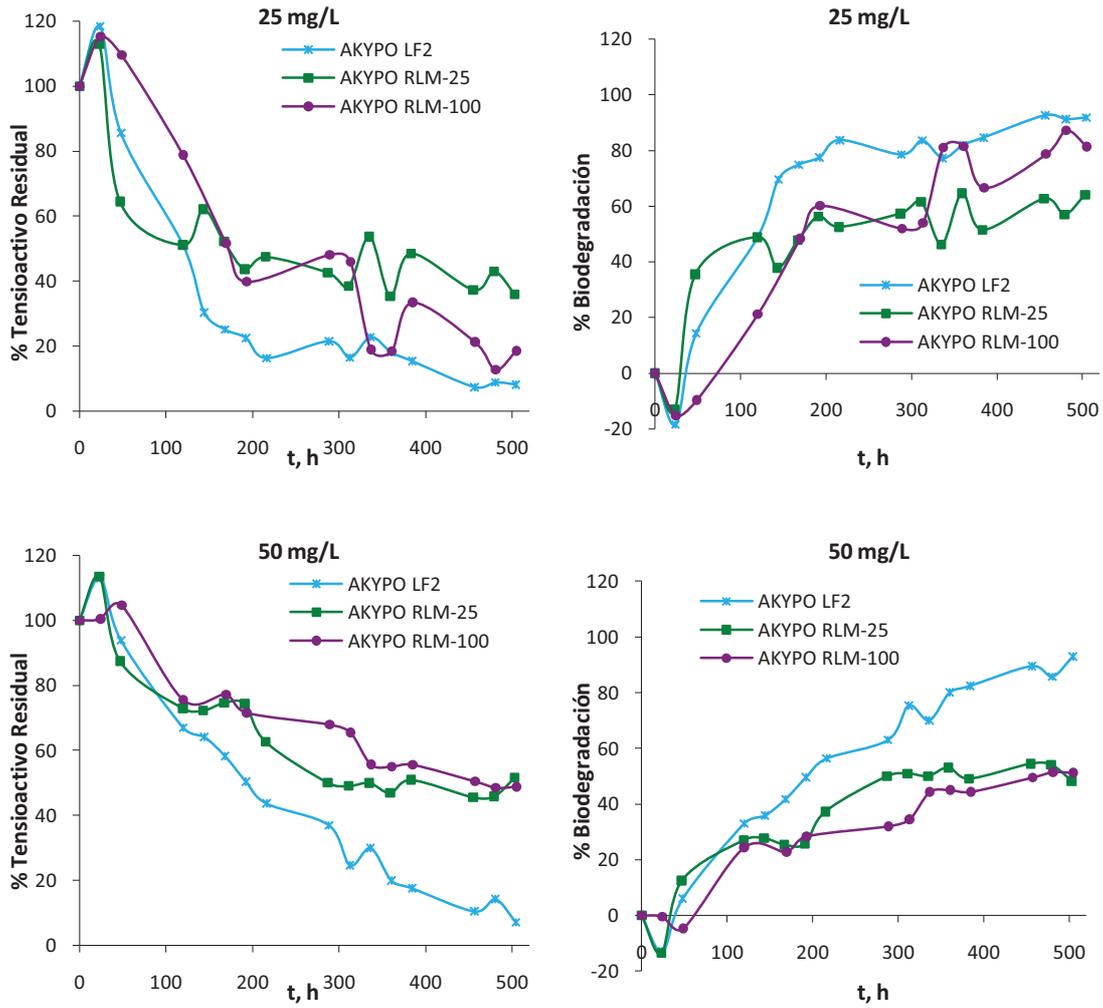


Figura V.2.- Variación del TOC residual y del porcentaje de biodegradación final con el tiempo para los AKYPO ensayados a 25 mg/L y 50 mg/L

Para todas las concentraciones ensayadas, excepto para 5 mg/L, el tensioactivo que alcanza mayor grado de biodegradación es el AKYPO LF2, que es el de menor longitud de cadena carbonada.

Comparando los dos tensioactivos de igual longitud de cadena, AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100, (C_{12} - C_{14}) y diferente grado de etoxilación, 3 y 10 respectivamente, se observa que para todas las concentraciones ensayadas el RLM-100, alcanza mayor biodegradabilidad, lo que hace pensar que para los ácidos alquil éter carboxílicos la biodegradabilidad es mayor para aquellos de mayor grado de etoxilación.

De forma general se puede decir que, de los ácidos alquiletercarboxílicos estudiados con este método de ensayo, el AKYPO LF2 es el que presenta mayor biodegradabilidad, mientras que el AKYPO RLM-25 es el de menor biodegradabilidad.

En la figura V. 3, se muestran los resultados obtenidos para la evolución del porcentaje de TOC residual y porcentaje de biodegradación final en función del tiempo a distintas concentraciones para los tensioactivos ensayados.

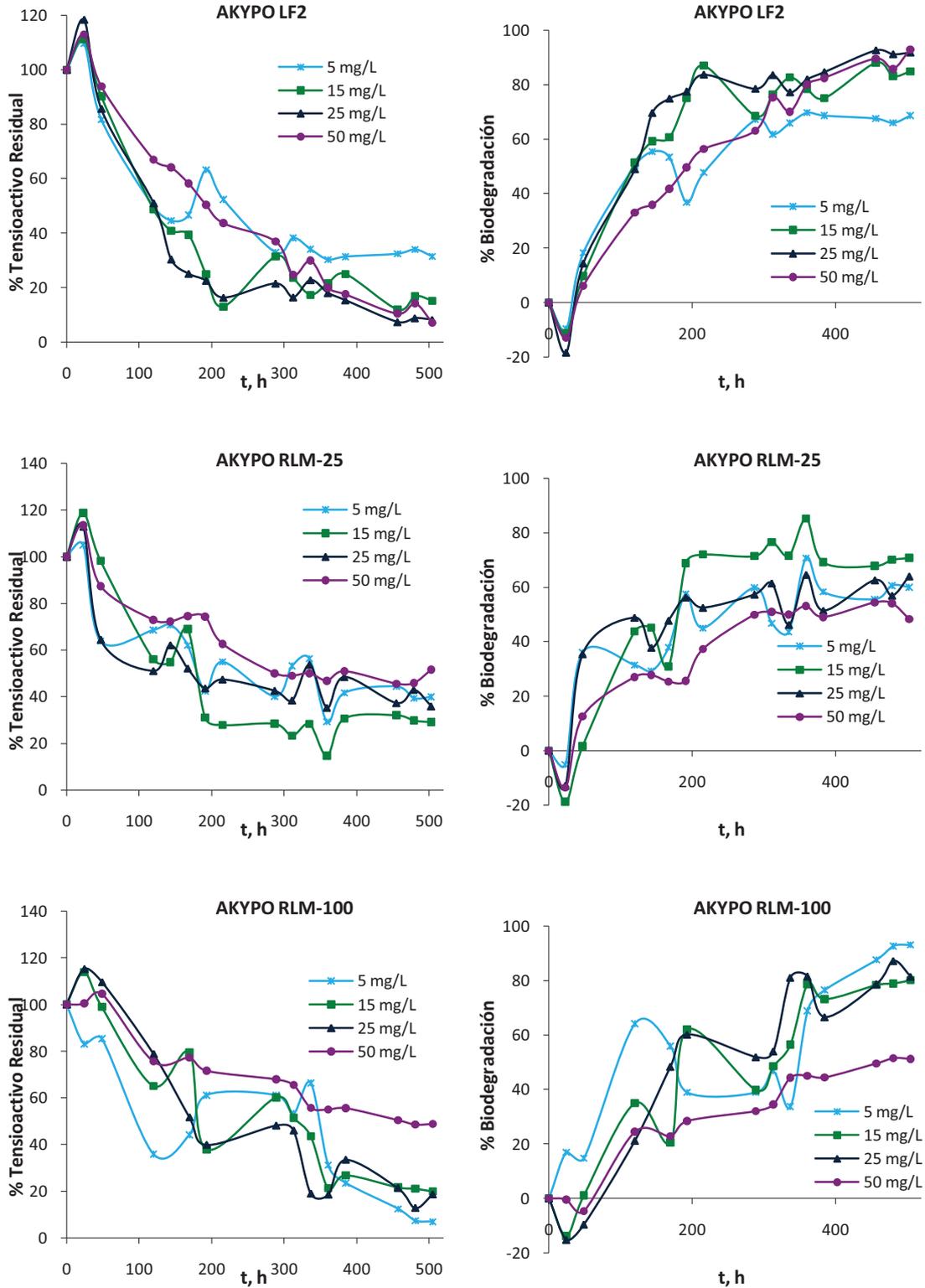


Figura V.3.- Influencia de la concentración de tensioactivo durante el proceso de biodegradación: evolución del porcentaje de TOC residual y porcentaje de biodegradación final en función del tiempo para los AKYPO ensayados

El comportamiento observado en las curvas de biodegradación final en función de la concentración difiere según el tensioactivo estudiado. Así por ejemplo para el AKYPO LF2, el aumento de la concentración inicial influye de forma positiva en la biodegradación. Se observa así, que para bajas concentraciones el % de TOC residual es mayor y se alcanza un porcentaje menor de biodegradación, 68% a 5 mg/L mientras que para 50 mg/L es del 93 %. Al contrario ocurre para AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100 para los que los mayores porcentajes de biodegradación se alcanzan para los valores de menor concentración, obteniéndose para 5 mg/L 60 % y 93% de biodegradabilidad respectivamente y para 50 mg/L 48% y 51%.

5.1.2 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

A fin de poder comparar los diferentes ensayos de biodegradación final se han definido una serie de parámetros característicos para los perfiles de biodegradación (Jurado, 2007).

El **tiempo de latencia (t_L)** es el tiempo que tardan en aclimatarse los microorganismos no adaptados al nuevo sustrato; suele corresponder con el periodo de tiempo durante el cual se produce un cambio suave de la concentración residual. Para cada ensayo de biodegradación se calcula trazando dos tangentes a la curva de biodegradación para las etapas de adaptación y biodegradación. El tiempo de latencia es el punto de corte de ambas rectas.

El período de latencia o aclimatación previo al proceso biodegradativo de compuestos orgánicos en el medio acuático puede tener varias causas tales como la falta de nutrientes, la inducción enzimática, predación por protozoos, mutación de especies, el crecimiento de una población microbiana capaz de metabolizar el sustrato, o simplemente la adaptación a la presencia de agentes tóxicos.

El **tiempo de vida media ($t_{1/2}$)** es el tiempo para el cual la concentración de sustrato disminuye a la mitad desde el inicio del proceso de biodegradación. Por lo tanto también se contabiliza el tiempo de latencia. Al igual que el tiempo de latencia, el tiempo de vida media se calcula mediante métodos gráficos sobre la curva de biodegradación.

La **Velocidad media de biodegradación (V_M)** se ha calculado como el cociente entre un porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo transcurrido para alcanzar ese valor de biodegradación. Para que los datos procedentes de los diferentes ensayos sean comparables entre sí, se ha fijado un valor de biodegradación del 50 % y se ha medido el tiempo que tarda en alcanzarse dicho valor de biodegradación. Este parámetro puede dar idea de la rapidez con la que está transcurriendo el proceso de biodegradación, además esta velocidad media por unidad de tiempo permite comparar todos los ensayos.

La **concentración de tensioactivo residual (S_R)** es la concentración que no ha sido degradada por los microorganismos, y representa la concentración de tensioactivo que no es metabolizable. En este caso se considera la concentración de carbono orgánico total residual, que está directamente relacionado con la concentración de tensioactivo. Se calcula como el valor medio del TOC al final del ensayo cuando éste permanece prácticamente constante con el tiempo de biodegradación.

La **biodegradabilidad del tensioactivo (B)** se define como el porcentaje de tensioactivo biodegradado a las 50 horas del ensayo.

El **porcentaje de Mineralización Final (Min)**, supone el % de tensioactivo que ha sido degradado completamente a sus constituyentes minerales, en donde el carbono orgánico es oxidado hasta CO_2 más agua.

En la Tabla V.2 se muestran los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para todos los tensioactivos y a todas las concentraciones ensayadas. S_0 es la concentración inicial del ensayo de biodegradación en mg/L y t_T el tiempo total de duración del ensayo en horas.

Tabla V. 2.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los ácidos alquil éter carboxílicos

AKYPO LF2							
S_0 , mg/L	t_T , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L	Min, %
5	504.00	19.50	22.50	120.0	0.42	1.39	68.62
15	504.00	11.50	22.50	117.5	0.43	1.37	84.05
25	504.00	16.00	22.30	122.5	0.42	1.17	91.88
50	504.00	7.00	22.50	195.0	0.26	1.85	91.96
AKYPO RLM-25							
S_0 , mg/L	t_T , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L	Min, %
5	504.00	37.00	20.00	180.3	0.28	1.17	60.61
15	504.00	3.63	32.50	180.3	0.28	2.31	70.83
25	504.00	37.50	18.80	173.3	0.29	4.77	64.06
50	504.00	14.00	20.00	289.5	0.18	10.85	52.28
AKYPO RLM-100							
S_0 , mg/L	t_T , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L	Min, %
5	504.00	15.50	50.00	97.4	0.53	0.20	92.88
15	504.00	2.00	20.00	173.7	0.28	1.31	80.12
25	504.00	--	23.80	181.6	0.29	2.06	81.42
50	504.00	--	45.00	467.1	0.11	11.82	51.33

En la figura V.4 se representa el efecto de la concentración sobre el tiempo de latencia para los tensioactivos ensayados.

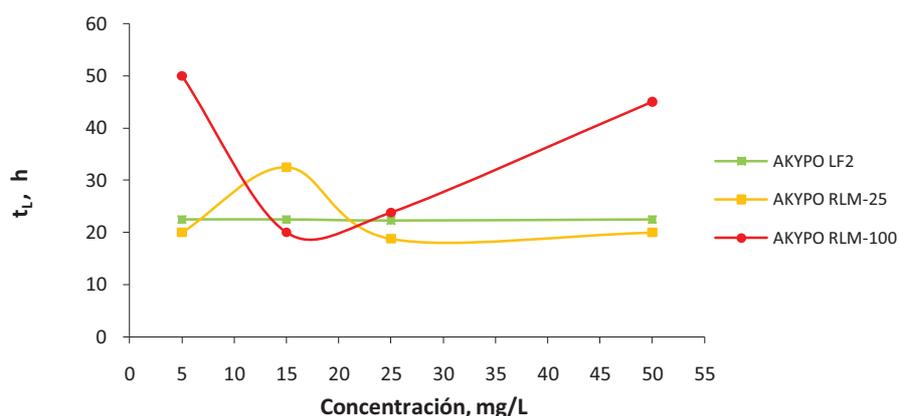


Figura V.4.- Efecto de la concentración en el tiempo de latencia para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.

Tanto para bajas concentraciones (5mg/L) como para altas (50 mg/L), el tiempo de latencia aumenta con el grado de etoxilación del tensioactivo. Ésto pone de manifiesto que cadenas etoxiladas de mayor tamaño muestran un aumento de la bioresistencia. Este efecto puede deberse al aumento de la hidrofiliidad y a que un aumento en las dimensiones moleculares limita el transporte de la molécula a través de las paredes celulares.

De la figura anterior, cabe destacar que para el tensioactivo AKYPO LF2, de menor longitud de cadena, la concentración no tiene prácticamente influencia sobre el tiempo de adaptación de los microorganismos.

En la Figura V.5 donde se representa el efecto de la concentración sobre la velocidad de biodegradación, se observa que al aumentar la concentración la velocidad disminuye. Analizando los datos se observa que de forma general que la velocidad media de biodegradación es mayor para el tensioactivo de cadena más corta (AKYPO LF2).

Si comparamos los dos tensioactivos de igual longitud de cadena pero diferente grado de etoxilación, AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100, la velocidad media de biodegradación es mayor para el que presenta menor grado de etoxilación.

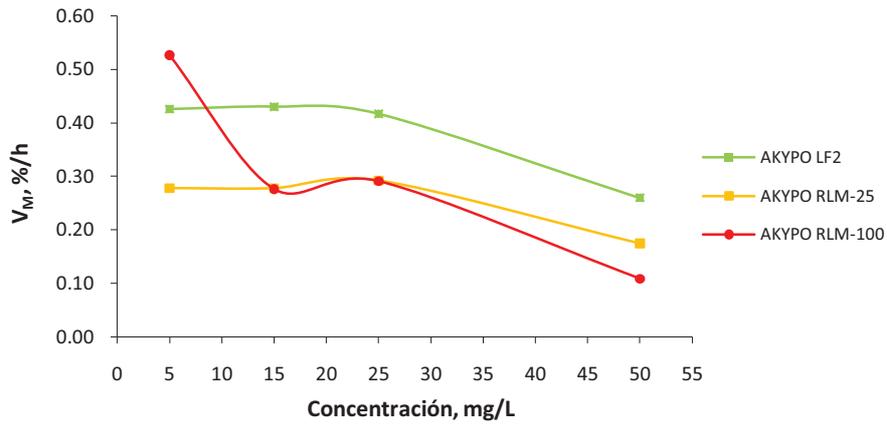


Figura V.5.- Efecto de la concentración en la velocidad media de biodegradación para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.

En la Figura V.6 donde se representa el % de Mineralización final alcanzado en función de la concentración, se pone de manifiesto que el comportamiento frente a la concentración de la mineralización final alcanzada es diferente según el tensioactivo estudiado.

De forma general se puede decir que para los AKYPO RLM-25 y RLM-100, de mayor longitud de cadena, la mineralización disminuye al aumentar la concentración de tensioactivo inicial, mientras que para AKYPO LF2 de cadena más corta, la mineralización es mayor con el aumento de concentración.

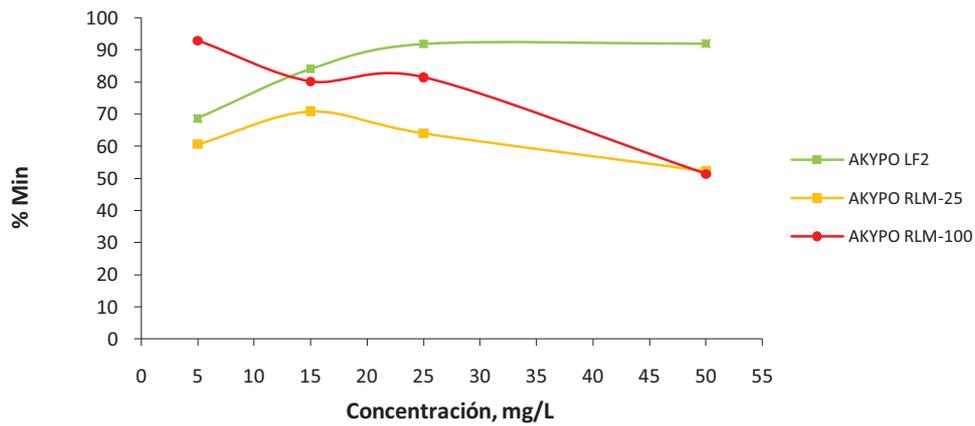


Figura V.6.- Efecto de la concentración en la Mineralización final para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.

5.1.3 BIODEGRADACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO

La biodegradación última de los ácidos alquil éter carboxílicos se ha medido utilizando el método de las botellas respirométricas, que miden la demanda biológica de oxígeno (DBO) del compuesto en función del tiempo.

En la Figura V.7 se representan las curvas de DBO para los AKYPO® ensayados a concentraciones iniciales de sustrato de 5mg/L, 15 mg/L, 25 mg/L y 50 mg/L. Además junto con cada experimento se realizó un ensayo patrón “Blanco” para tener en cuenta la DBO endógena, la cual corresponde al consumo de oxígeno debido a la respiración básica del inóculo sin la adicción de una fuente de carbono biodegradable.

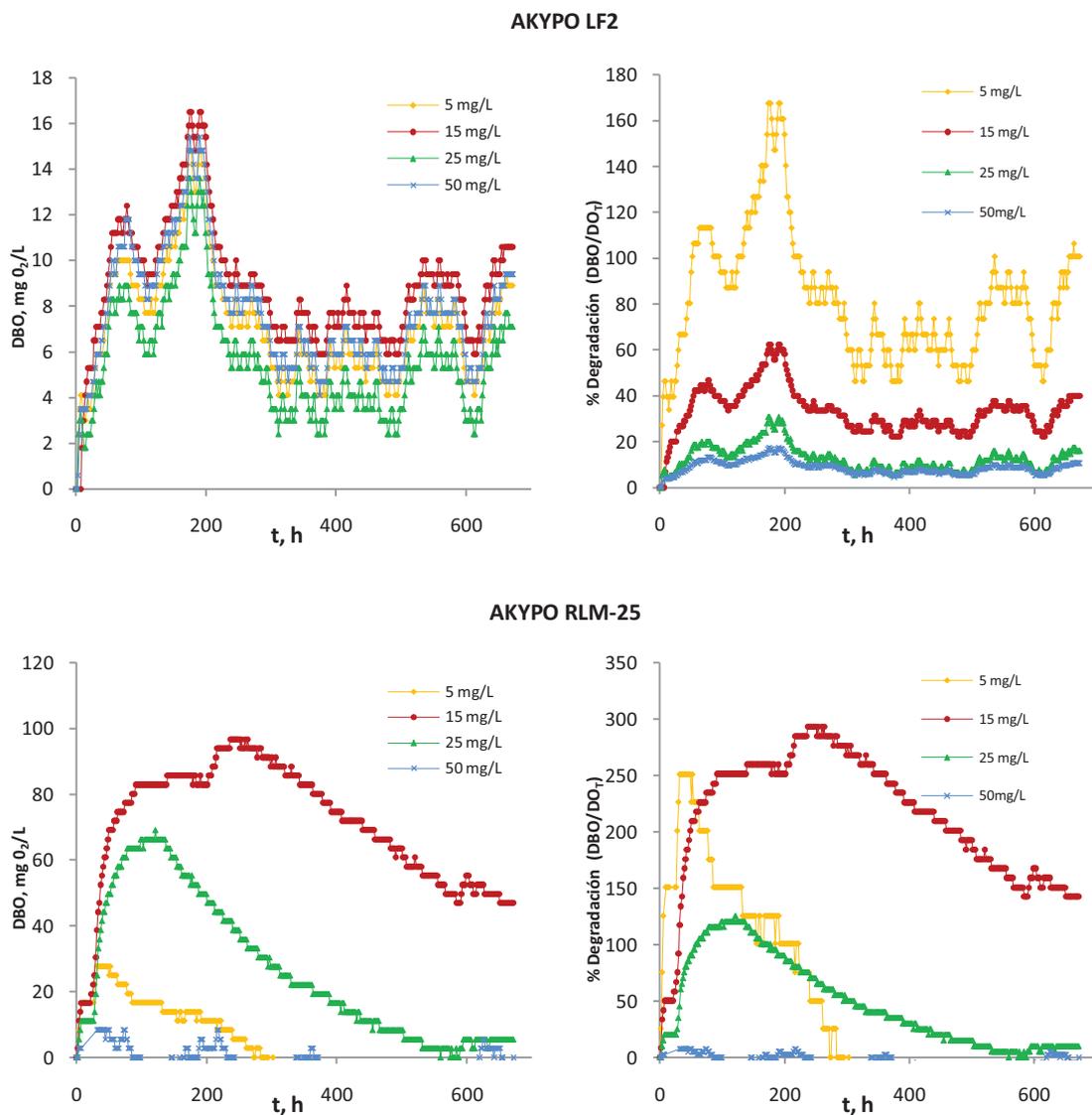


Figura V.7.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes AKYPO

AKYPO RLM-100

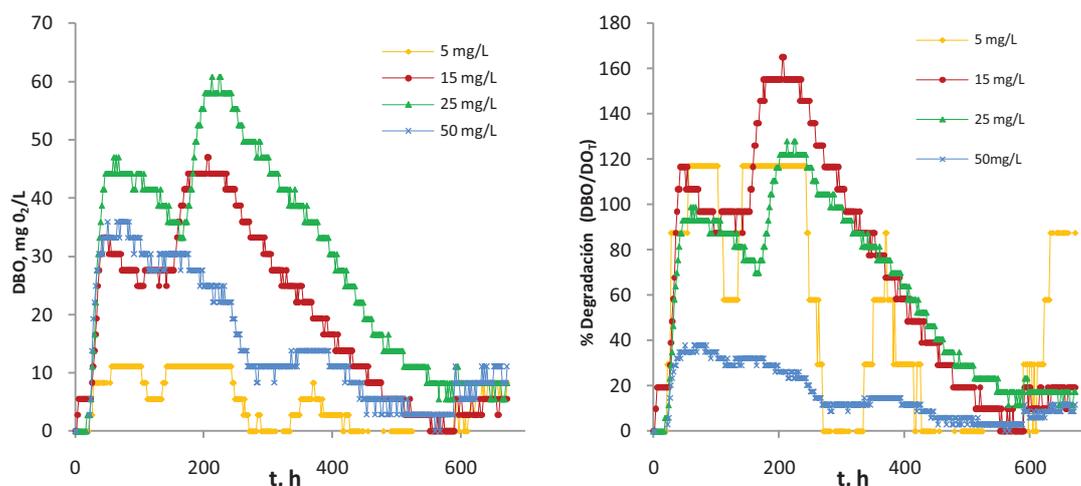


Figura V.7 (Continuación).-Curvas de DBO y biodegradación última por el método respirométrico para diferentes AKYPO

Para el tensioactivo AKYPO LF2, de menor longitud de cadena, se observa que la concentración inicial influye en el proceso de biodegradación, de modo que al aumentarla disminuye la biodegradación alcanzada.

En la Tabla V.3 se muestra la equivalencia entre las distintas formas de expresar la concentración de tensioactivo: en mg/L, como demanda teórica de oxígeno (mg DO_T/L) y en mg C/L. También se incluye la concentración de tensioactivo (S_{real}) teniendo en cuenta la materia activa del mismo (Tabla V.1).

Tabla V.3.- Equivalencia entre la concentración de los ácidos alquiletercarboxílicos en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico

S ₀ , mg/L	AKYPO LF2			AKYPO RLM-25			AKYPO RLM-100		
	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L
5	4.45	8.83	2.57	4.70	11.00	3.04	4.50	9.50	2.70
15	13.35	26.49	7.71	14.10	33.00	9.11	13.50	28.50	8.12
25	22.25	44.17	12.85	23.50	55.00	15.18	22.50	47.50	13.54
50	44.5	88.30	25.71	47.00	110.00	30.40	45.00	95.00	27.07

5.1.4 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LOS PERFILES DE BIODEGRADACIÓN

En todas las curvas de degradación obtenidas si se representa el cociente (DBO/DO_T) en función del tiempo, se observa que existe una fase de latencia o aclimatación, una fase de degradación (de incremento exponencial) y una zona de mineralización. Figura V.9.

De acuerdo con Blok (Blok, 1996) los parámetros cinéticos de crecimiento del modelo de Monod, μ y K_s se pueden calcular a partir de los perfiles respirométricos. (Figura V.9).

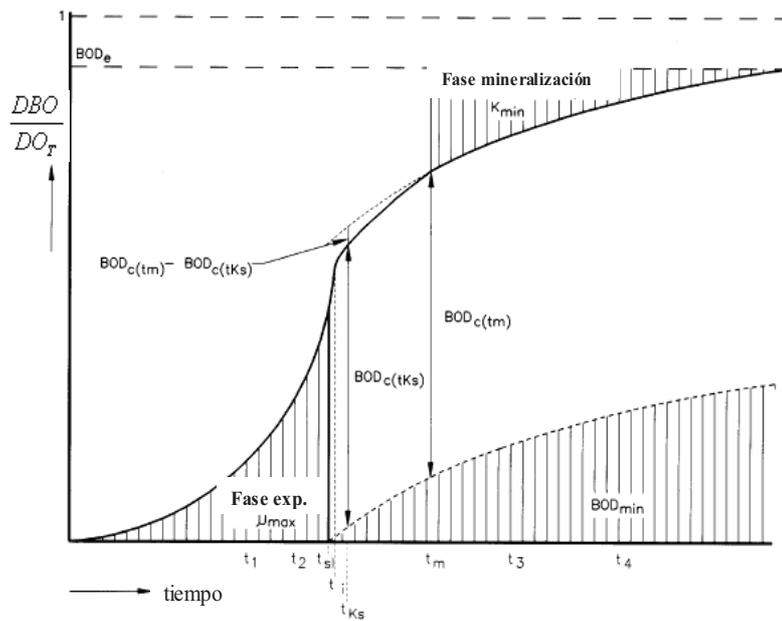


Figura V.8.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok (Blok.1996)

En este estudio se calcularán para la caracterización de las curvas de biodegradación, el tiempo de latencia, la mineralización y la tasa específica de crecimiento de los microorganismos.

El tiempo de latencia (t_l) se puede estimar como el tiempo necesario para alcanzar un 10 % de la biodegradación y la mineralización (% Min), es decir el grado de biodegradación, se calcula como la DBO/DO_T al final del experimento.

Los valores de la tasa específica de crecimiento de los microorganismos (μ) se obtienen de la parte exponencial del perfil respirométrico de acuerdo con:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{DBO_{t_2}}{DBO_{t_1}}\right)}{t_2 - t_1}$$

Ecuación V.3

donde t_1 y t_2 son dos puntos cualquiera de la fase exponencial, y DBO_{t_1} y DBO_{t_2} sus valores correspondientes.

Tabla V.4.-Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para ácidos alquil éter carboxílicos por el método respirométrico

AKYPO LF2				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
5	672.00	0.10	100	0.45
15	672.00	0.47	40.01	0.39
25	672.00	1.27	16.07	0.33
50	672.00	2.13	10.64	0.23
AKYPO RLM-25				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
5	672.00	0.02	--	1.87
15	672.00	0.05	--	1.18
25	672.00	0.18	10.02	0.99
50	672.00	--	--	0.87
AKYPO RLM-100				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
5	672.00	0.88	87.41	3.49
15	672.00	0.19	19.31	2.44
25	672.00	0.99	17.48	2.00
50	672.00	1.04	11.69	1.69

De los resultados anteriores se observa que tiempo de latencia se ve afectado por la concentración, incrementándose a medida que aumenta la concentración inicial de tensioactivo. El menor tiempo de latencia se obtiene para el AKYPO RLM-25 a 5mg/L, 0.02 h, y el más elevado para el AKYPO LF2 a concentración de 50 mg/L, 2.13 h, (Figura V.9).

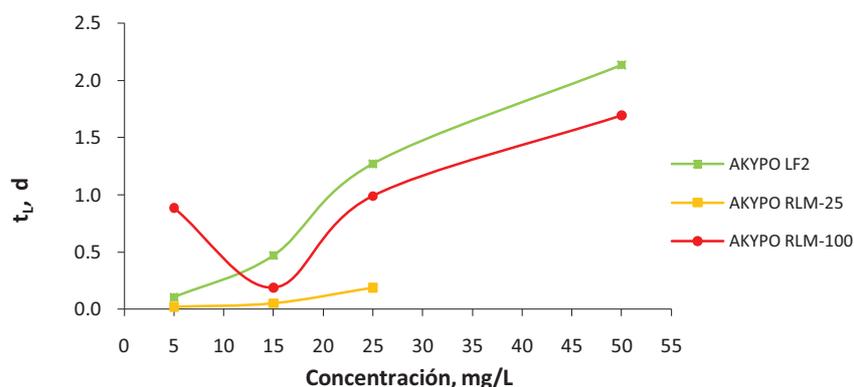


Figura V.9.- Efecto de la concentración sobre el tiempo de Latencia para ácidos alquil éter carboxílicos.

En cuanto a la tasa específica de crecimiento de microorganismos, el valor más pequeño obtenido es para el AKYPO LF2, para el que se alcanza el mayor porcentaje de

mineralización a 5 y 15 mg/L. En cambio el tensioactivo para el que se obtiene mayor tasa de crecimiento es el AKYPO RLM-100, para el que también se alcanzan porcentajes altos de mineralización, obteniéndose los mayores datos de altas concentraciones (25 y 50 mg/L) respecto a los otros tensioactivos.

Para los tres tensioactivos ensayados la concentración juega un papel importante en la tasa de crecimiento de los microorganismos, lo que supone que, al aumentar la concentración inicial de tensioactivo disminuye dicha tasa (Figura V.10).

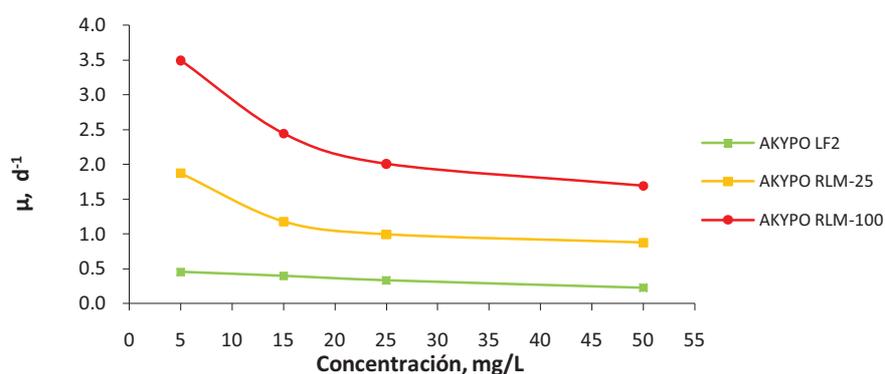


Figura V.10.- Influencia de la concentración en la Tasa específica de crecimiento (μ) de microorganismos para AKYPO

De acuerdo con Blok (Blok 1996), los valores de μ obtenidos por el método respirométrico, y que no dependen del tiempo total en el que se ha realizado el ensayo, también permiten clasificar los tensioactivos como recalcitrantes ($\mu < 0.1 \text{ d}^{-1}$), con biodegradabilidad inherente ($0.1 < \mu < 1.5 \text{ d}^{-1}$) y fácilmente biodegradables ($\mu > 1.5 \text{ d}^{-1}$).

Según esta clasificación el tensioactivo de mayor longitud de cadena y mayor grado de etoxilación, AKYPO RLM-100, se podría clasificar como fácilmente biodegradable, ya que tiene un valor comprendido entre 3.49 y 1.69 d^{-1} para las concentraciones ensayadas. El AKYPO RLM-25 se considera de biodegradabilidad inherente para concentraciones superiores a 5 mg/L y fácilmente biodegradable a concentraciones inferiores. El tensioactivo AKYPO LF2 se considera de biodegradabilidad inherente para todas las concentraciones ensayadas.

De acuerdo con la OCDE (OECD, 1993b) y el Reglamento CE nº 648/2004 (Reglamento CE 648, 2004), una sustancia se considera fácilmente biodegradable si el tanto por ciento de mineralización alcanzado es al menos del 60% en un plazo de 28 días cuando se somete a ensayo respirométrico. Los resultados obtenidos indican que este requisito en las condiciones ensayadas sólo se cumple para AKYPO LF2 y RLM-100 a concentraciones de 5 mg/L .

5.2 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS

Los alquilpoliglucósidos (APG) pertenecen a una familia de tensioactivos no iónicos cuyo resto apolar es una cadena hidrocarbonada y cuya cabeza polar está formada por un polímero de moléculas de glucosa. El número de unidades de *D*-glucosa varía entre 1 y 5. La cadena alquílica contiene entre 6 y 18 átomos de carbono. Durante los últimos 20 años ha aumentado mucho el interés por estos tensioactivos debido a su compatibilidad y efecto sinérgico cuando se combinan con otros tensioactivos, así como a su baja toxicidad y mínimo impacto ambiental. Por tanto, dado el potencial futuro que pueden alcanzar y su amplia distribución en el medio ambiente acuático, es esencial que este grupo de tensioactivos sean compatibles con los sistemas de tratamiento de aguas residuales para que no causen efectos adversos en el medio ambiente.

La biodegradación es el principal mecanismo de eliminación de los compuestos orgánicos en el medio ambiente. El conocimiento de la biodegradabilidad y toxicidad de tensioactivos es una necesidad para la decisión de su inclusión en formulaciones detergentes, ya que estos compuestos están siendo sometidos cada vez a controles medioambientales más estrictos. Al tratarse de una nueva clase de tensioactivos, son muy escasos los estudios encaminados a conocer la biodegradabilidad de los APG.

Para el estudio de la biodegradabilidad de los APG se ha seleccionado el método respirométrico en el que se mide la DBO utilizando las botellas OxiTop Control. (apartado 3.2.2). La medida de la DBO tiene la ventaja de que es un parámetro biológico que mide directamente la degradación aerobia, (Reuschenbach, 2003). Este último método se utiliza para determinar la biodegradabilidad final o mineralización de los APG.

Para el estudio de la biodegradación de los APG se han utilizado tres tensioactivos comerciales: GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 y GLUCOPON 650. Las propiedades de estos tensioactivos comerciales se muestran en la Tabla V.5, donde se indican la longitud de la cadena alquílica (R), el grado de polimerización (DP), el peso molecular medio PM_{medio} , la concentración micelar crítica (CMC), el balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y el % de humedad.

Tabla V.5: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados

NOMBRE COMERCIAL	R	DP	PM_{medio}	CMC, mg/L	HLB	%Humedad
GLUCOPON 215 ®	C8-C10	1.42	390	1012	12.6	37.0
GLUCOPON 600 ®	C12-C14	1.59	386	50	12.7	46.6
GLUCOPON 650 ®	C8-C14	1.35	397	153	12.8	50.4

5.2.1 BIODEGRADACIÓN MEDIANTE EL MÉTODO RESPIROMÉTRICO

La biodegradación última de los alquilpoliglucósidos se ha medido utilizando el método de las botellas respirométricas, que miden la demanda biológica de oxígeno (DBO) del compuesto en función del tiempo. Este método se ha aplicado para estudiar la influencia de la concentración y de la estructura del tensioactivo sobre el proceso de biodegradación última.

En la figura V.11 se representan las curvas de DBO y el porcentaje de degradación para los alquilpoliglucósidos ensayados a concentraciones iniciales de sustrato de 15mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L y 100 mg/L. Además junto con cada experimento se realizó un ensayo patrón “Blanco” para tener en cuenta la DBO endógena, la cual corresponde al consumo de oxígeno debido a la respiración básica del inóculo sin la adición de una fuente de carbono biodegradable.

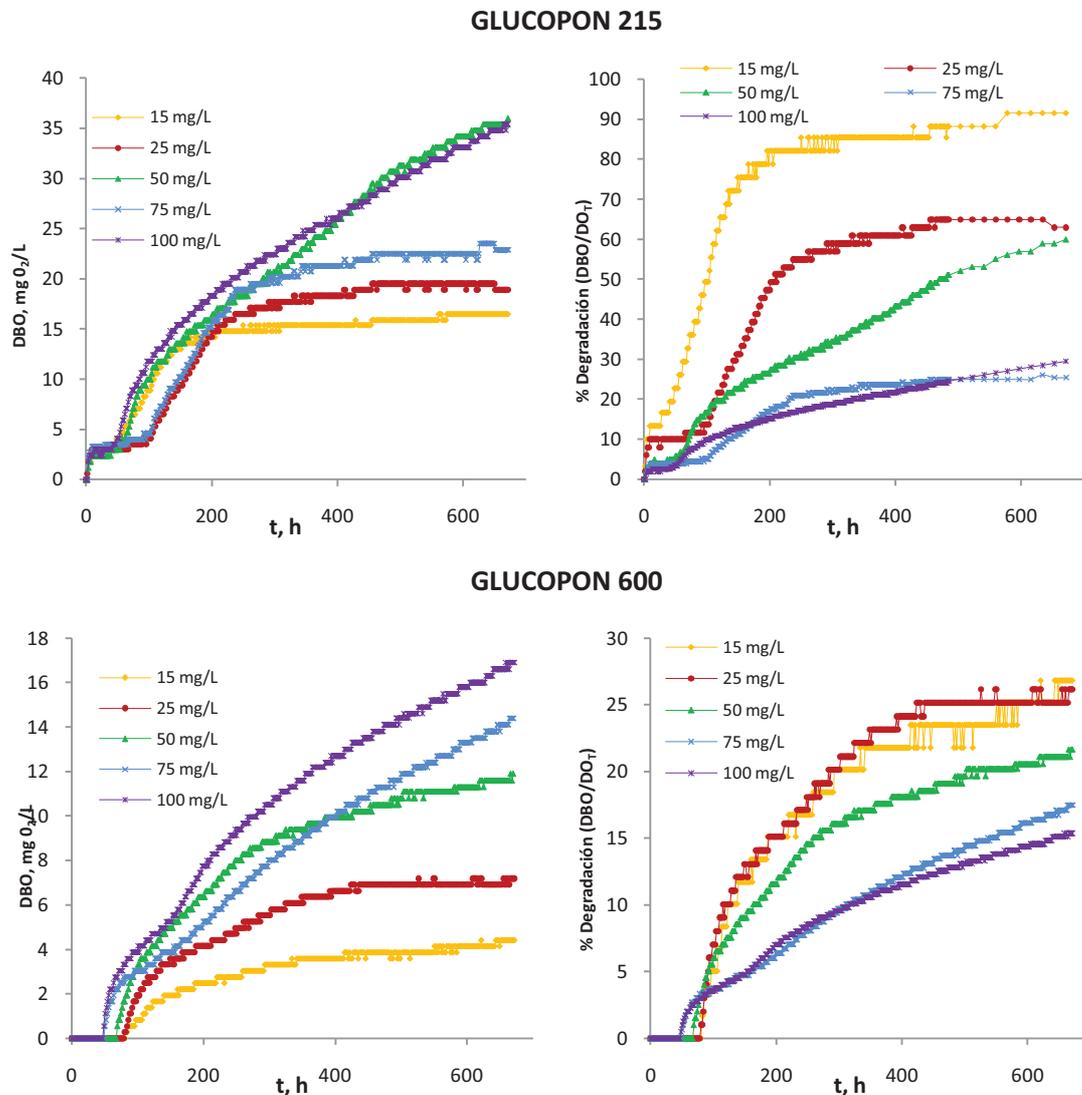


Figura V.11.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG

GLUCOPON 650

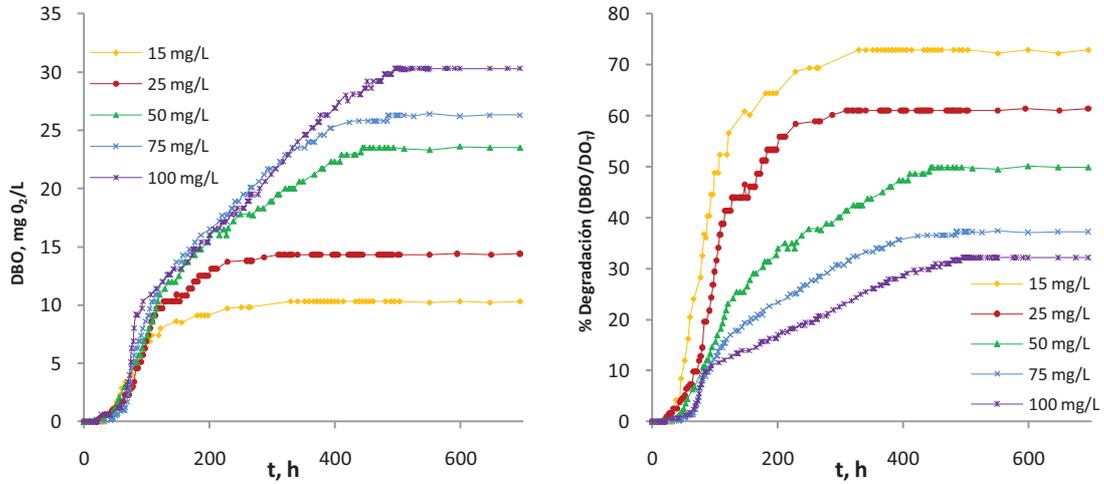


Figura V.11 (Continuación).- Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes alquilpoliglucósidos.

Las curvas mostradas en la figuras anteriores presentan una forma sigmoïdal lo que evidencia un mecanismo de eliminación biológica para los alquilpoliglucósidos. También se puede observar que para los procesos de biodegradación de los tres tensioactivos, la concentración inicial de tensioactivo ensayada tiene una gran influencia, disminuyendo la biodegradación a medida que aumenta la concentración de tensioactivo.

En la figura V.12, se comparan las curvas respirométricas para los distintos APG ensayados a la misma concentración inicial de tensioactivo.

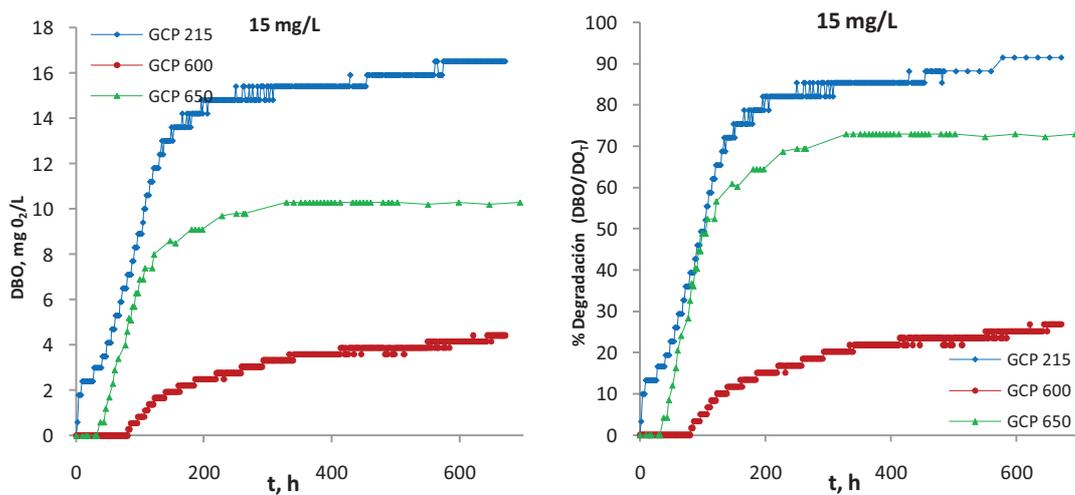


Figura V.12.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG, a la misma concentración inicial de sustrato

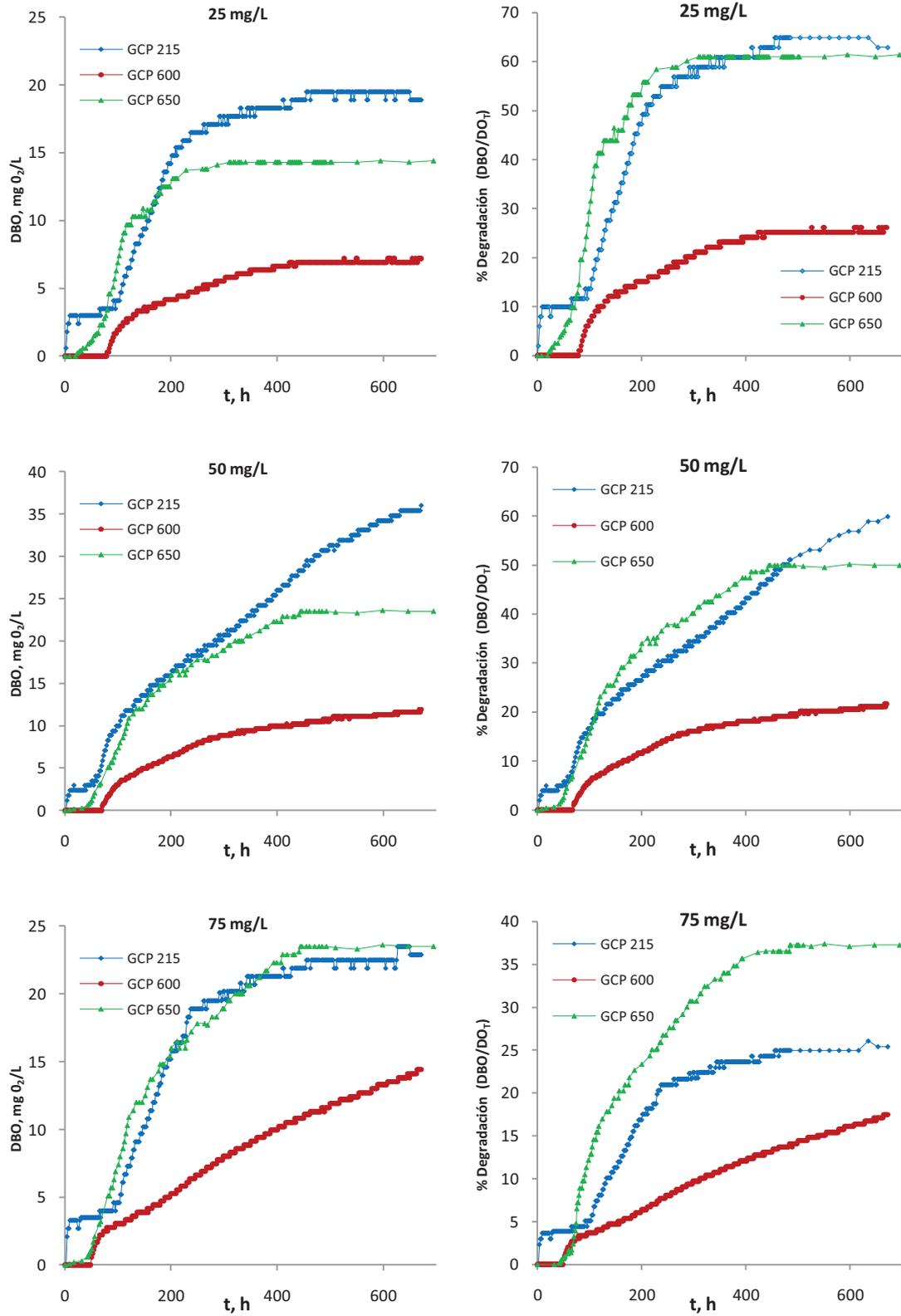


Figura V.12 (Continuación).-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG, a la misma concentración inicial de sustrato

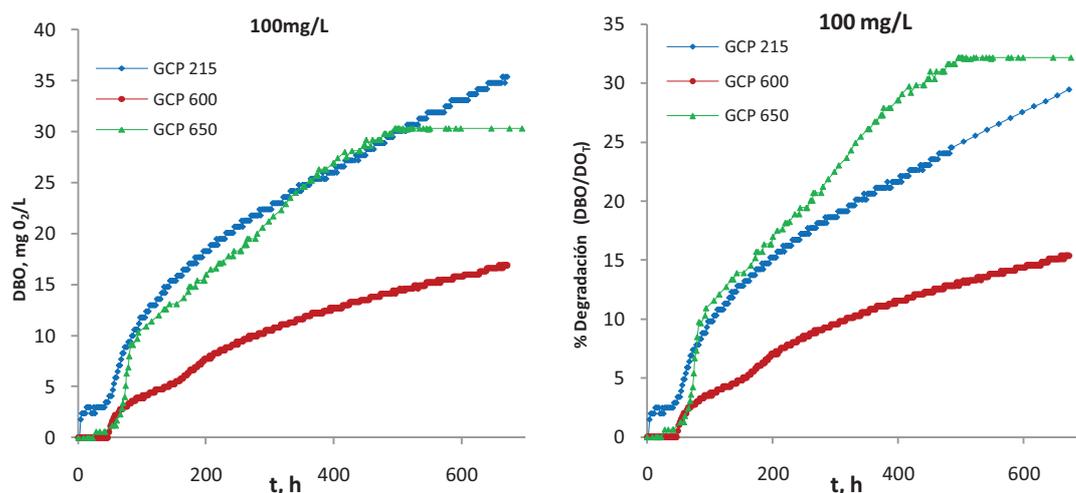


Figura V.12 (Continuación).-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG, a la misma concentración inicial de sustrato

La Figura V.12, donde se comparan los tres tensioactivos a la misma concentración inicial, muestran que el tensioactivo GLUCOPON 215 de menor cadena carbonada (Tabla V.5), es el más biodegradable a las concentraciones iniciales inferiores, 15 mg/L, 25 mg/L y 50 mg/L, mientras que para concentraciones superiores 75 mg/L y 100 mg/L, el más biodegradable es el GLUCOPON 650, que presenta menor contenido de moléculas de glucosa y mayor longitud de cadena que GLUCOPON 215 (Tabla V.5). Para todas las concentraciones de tensioactivo iniciales el GLUCOPON 600, de mayor longitud de cadena carbonada y número de moléculas de glucosa, es el que presenta menor biodegradabilidad.

En la tabla V.6 se muestra la equivalencia entre las distintas formas de expresar la concentración de tensioactivo: en mg/L, como demanda teórica de oxígeno (mg DO_T/L) y en mg C/L. También se incluye la concentración de tensioactivo (S_{real}) teniendo en cuenta la humedad del mismo (Tabla V.6).

Tabla V.6.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico

S ₀ , mg/L	GLUCOPON 215			GLUCOPON 600			GLUCOPON 650		
	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L	S _{real} , mg/L	mg DO _T /L	mg C/L
15	9.45	18.03	5.33	8.01	16.48	4.89	7.44	14.10	4.36
25	15.75	30.05	8.89	13.35	27.47	8.16	12.40	23.50	7.27
50	31.50	60.11	17.79	26.70	54.95	16.33	24.80	47.10	14.54
75	47.25	90.16	26.68	40.05	82.43	24.50	37.20	70.60	21.81
100	63.00	120.22	35.58	53.40	109.91	32.67	49.60	94.20	29.08

5.2.2 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LOS PERFILES DE BIODEGRADACIÓN

En todas las curvas de degradación obtenidas si se representa el cociente (DBO/DO_T) en función del tiempo, se observa que existe una fase de latencia o aclimatación, una fase de degradación (de incremento exponencial) y una zona de mineralización. Figura V.13.

De acuerdo con Blok (Blok, 1996) los parámetros cinéticos de crecimiento del modelo de Monod, μ y K_S se pueden calcular a partir de los perfiles respirométricos. (Figura V.13).

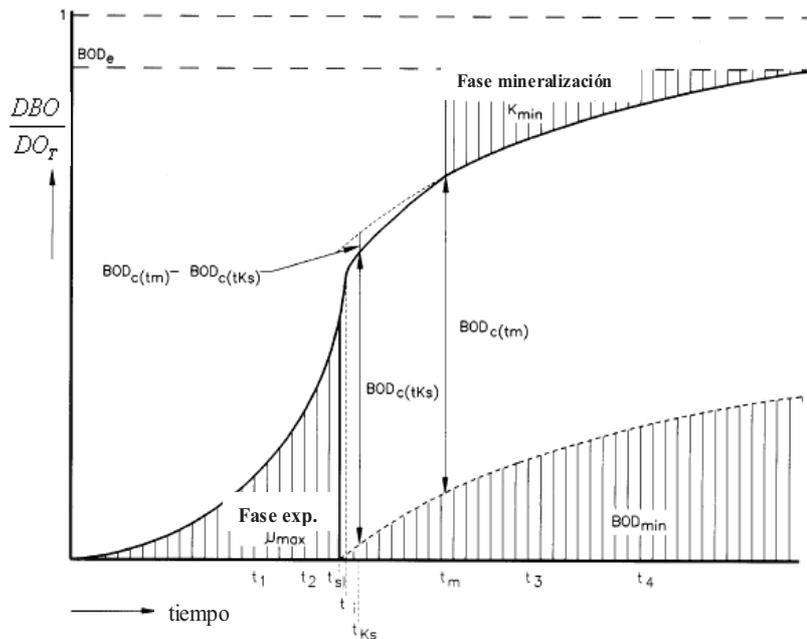


Figura V.13.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok (Blok, 1996)

En este estudio se calcularán para la caracterización de las curvas de biodegradación, el tiempo de latencia, la mineralización y la tasa específica de crecimiento de los microorganismos.

El tiempo de latencia (t_l) se puede estimar como el tiempo necesario para alcanzar un 10 % de la biodegradación y la mineralización (% Min), es decir el grado de biodegradación, se calcula como la DBO/DO_T al final del experimento.

Los valores de la tasa específica de crecimiento de los microorganismos (μ) se obtienen de la parte exponencial del perfil respirométrico de acuerdo con:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{DBO_{t_2}}{DBO_{t_1}}\right)}{t_2 - t_1}$$

Ecuación V.4

donde t_1 y t_2 son dos puntos cualquiera de la fase exponencial, y DBO_{t_1} y DBO_{t_2} sus valores correspondientes.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.7.

Tabla V.7.-Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para APG por el método respirométrico

GLUCOPON 215				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
15	672.00	0.23	91.51	0.87
25	672.00	1.16	62.89	0.73
50	672.00	3.03	59.89	0.52
75	672.00	5.52	25.39	0.48
100	672.00	4.43	29.44	0.40
GLUCOPON 600				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
15	672.00	5.13	26.82	0.69
25	672.00	5.28	26.17	0.57
50	672.00	6.84	21.65	0.39
75	672.00	12.90	17.46	0.25
100	672.00	13.22	15.37	0.18
GLUCOPON 650				
S_0 , mg/L	t_T , h	t_L , d	% Min	μ , d^{-1}
15	672.00	2.02	72.94	0.95
25	672.00	2.97	61.40	0.90
50	672.00	3.38	49.91	0.74
75	672.00	3.79	37.24	0.68
100	672.00	3.85	32.17	0.54

Según los resultados obtenidos se observa que el menor tiempo de latencia o de adaptación de los microorganismos es el obtenido para el GLUCOPON 215, de menor longitud de cadena, mientras que para el que se requiere mayor tiempo de adaptación es el GLUCOPON 600, de mayor longitud de cadena. Para los tres tensioactivos este tiempo se ve incrementado con el aumento de la concentración.

En cuanto a la tasa específica de crecimiento de microorganismos, los valores más pequeños se obtienen para el GLUCOPON 600, que es para el que se alcanzan los menores porcentajes de biodegradación. En cambio el tensioactivo para el que se obtiene mayor tasa de crecimiento es GLUCOPON 650. Estos valores están influenciados por la concentración

inicial de tensioactivo, de modo que al aumentar la concentración disminuye dicha tasa, tal y como se muestra en la Figura V.14.

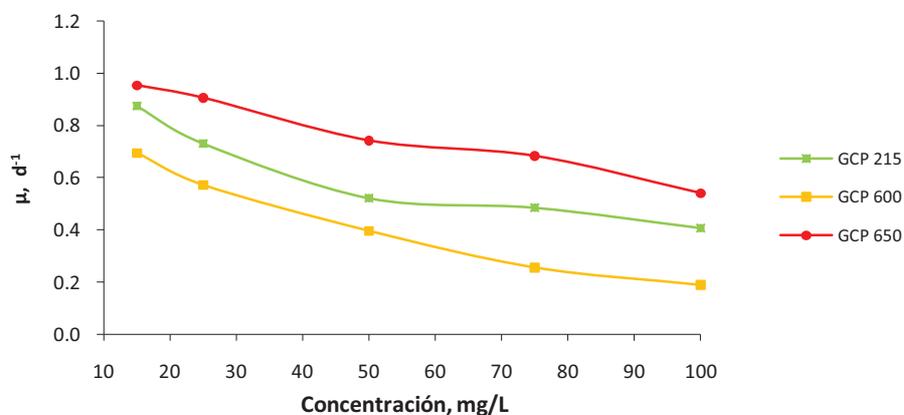


Figura V-14.- Influencia de la concentración en la tasa específica de crecimiento (μ) de microorganismos para alquilpoliglucósidos

De acuerdo con Blok (Blok, 1996), los valores de μ obtenidos por el método respirométrico, y que no dependen del tiempo total en el que se ha realizado el ensayo, también permiten clasificar los tensioactivos como recalcitrantes ($\mu < 0.1 \text{ d}^{-1}$), con biodegradabilidad inherente ($0.1 < \mu < 1.5 \text{ d}^{-1}$) y fácilmente biodegradables ($\mu > 1.5 \text{ d}^{-1}$).

Según esta clasificación los tres alquilpoliglucósidos ensayados, GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 y GLUCOPON 650 se podrían clasificar como de biodegradabilidad inherente, para todas las concentraciones ensayadas.

El mayor porcentaje de biodegradación final obtenido es para el GLUCOPON 215, de menor longitud de cadena carbonada, que alcanza un 91.51 % de mineralización para concentración de 15 mg/L. Los menores porcentajes se obtienen para el GLUCOPON 600, de mayor longitud.

De acuerdo con la OCDE (OECD, 1993b) y el Reglamento CE nº648/2004 (Reglamento CE nº 648, 2004) una sustancia se considera fácilmente biodegradable si el tanto por ciento de mineralización alcanzado es al menos 60% en un plazo de 28 días cuando se somete al ensayo respirométrico. Los resultados obtenidos indican que este requisito sólo se cumple el GLUCOPON 215 y GLUCOPON 650 a concentraciones iguales o inferiores a 25 mg/L. De acuerdo a este criterio el GLUCOPON 600 no será fácilmente biodegradable a ninguna de las concentraciones ensayadas. No obstante, las concentraciones reales existentes de estos tensioactivos en el medio ambiente son siempre menores de 5 mg/L.

5.3 BIODEGRADABILIDAD DE ALCOHOLES GRASOS ETOXILADOS

Los alcoholes grasos etoxilados (AGE) son el segundo grupo más importante de tensioactivos, después del LAS, en cuanto a manufactura, y el primer grupo dentro de la familia de los tensioactivos no iónicos etoxilados (Szymanski, 2000). En Europa se venden cada año $5 \cdot 10^5$ toneladas de estos tensioactivos, la mayoría de ellos utilizados en formulaciones detergentes. Los AGE son considerados como tensioactivos “fácilmente biodegradables”, sin embargo, los vertidos masivos de estos tensioactivos a las aguas residuales requieren un estricto control para prevenir la contaminación del medio ambiente acuático. Un elemento clave en este proceso es la evaluación de la biodegradabilidad para garantizar el uso de estos tensioactivos en las formulaciones domésticas o industriales.

Los alcoholes grasos etoxilados más típicos son los que van del rango de 9 a 18 átomos de carbono, y los más comunes son aquellos de 12 a 15 átomos de carbono o mezclas de ellos. Los AGE utilizados en este trabajo pertenecen a los llamados oleoquímicos, es decir, procedentes de fuentes naturales y renovables: FINDET 1618A/18 y FINDET 1214N/23, de Kao Corporation, S.A. Las propiedades de estos tensioactivos se describen en la Tabla V.8, donde se indican la longitud de la cadena carbonada (R), el número de unidades de óxido de etileno (n), la concentración micelar crítica (CMC) y el balance hidrófilo-lipófilo (HLB).

Tabla V.8: Propiedades de los alcoholes grasos etoxilados utilizados

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	R	n	CMC, mg/L	HLB
FINDET® 1214N/23	Laureth-11 + Myreth-11	C12 70% C14 30%	11	88.20	14.3
FINDET® 1618A/18	Ceteth-11 + Steareth-11	C16-C18	6	0.81	10.2

Para el estudio de la biodegradabilidad se han realizado tres experimentos con ensayo estático (apartado 3.2.1), FINDET 1214N/23 a 50 y 100 mg/l de concentración inicial y FINDET 1618A/18 a 50 mg/l de concentración inicial. La concentración de tensioactivo residual se midió utilizando el método colorimétrico del reactivo yodo-yoduro (apartado 3.3.1.2.). El proceso de biodegradación también se sigue mediante el método del crecimiento de la Biomasa (apartado 3.3.2), utilizando el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Con objeto de comprobar la actividad de la población microbiana presente en el medio de ensayo se realizó un ensayo de referencia con un tensioactivo fácilmente biodegradable (LAS). La concentración inicial del ensayo de referencia fue de 5 mg/L, y la biodegradabilidad media alcanzada a los 5 días fue del 93.71 %. De acuerdo con la NORMA UNE 55-844-91 (UNE

55-844-91), para aceptar la validez del ensayo, el porcentaje de biodegradación del patrón blando al cabo de 5 días debe ser mayor del 90% (apartado 3.2.1.6.).

5.3.1 BIODEGRADABILIDAD PRIMARIA

En la Figura V. 15, se presentan los perfiles de biodegradación primaria obtenidos para los tensioactivos ensayados. La concentración se expresa como porcentaje de tensioactivo residual y como porcentaje de biodegradación.

El porcentaje de tensioactivo residual y de biodegradación se calculan a partir de las siguientes expresiones:

$$\% \text{ Tensioactivo residual} = \frac{[S]_t}{[S]_0} \cdot 100$$

Ecuación V.5

$$\% \text{ Biodegradación} = \frac{[S]_0 - [S]_t}{[S]_0} \cdot 100$$

Ecuación V.6

donde: $[S]_t$ = concentración de sustrato en un instante t

$[S]_0$ = concentración de sustrato al comienzo del ensayo

Todos los perfiles de biodegradación obtenidos presentan tres fases bien diferenciadas:

1. Fase de aclimatación de los microorganismos, caracterizada porque la concentración de tensioactivo se mantiene prácticamente constante. En esta primera etapa, y debido a la acumulación y adsorción del tensioactivo en las interfases, se observan algunas variaciones de la concentración de tensioactivo residual.
2. Disminución rápida de la concentración de tensioactivo debido a la metabolización por parte de los microorganismos del mismo.
3. Período donde la concentración de tensioactivo residual permanece prácticamente constante, aunque puede continuar la biodegradación de los metabolitos producidos durante el proceso de biodegradación.

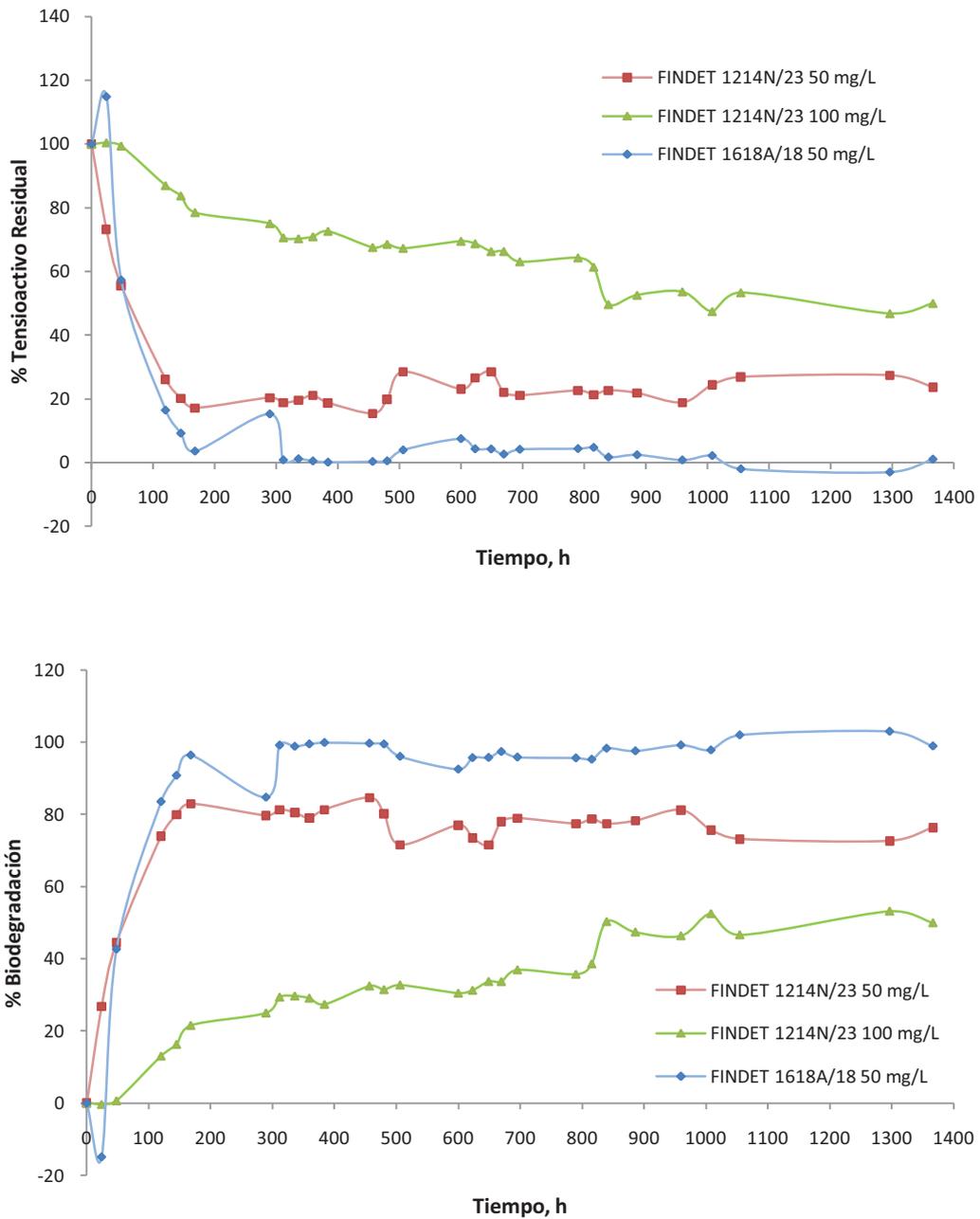


Figura V.15.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación con el tiempo para los AGE ensayados

De los resultados y curvas obtenidos (Figura V.15) se observa que al tratarse de concentraciones iniciales muy elevadas de 50 mg/L y 100 mg/L, para ninguno de los tensioactivos ensayados se alcanza un porcentaje de degradación superior al 80 % en 4 días, tal y como exige la legislación vigente (Reglamento CE Nº 648, 2004) cuando se aplica el test de la OCDE (OECD, 1993b).

Únicamente para el ensayo con FINDET 1618A/18 a 50 mg/L se produce una completa biodegradación del tensioactivo con el tiempo. Para el otro tensioactivo FINDET 1214N/23 permanece una concentración residual de tensioactivo que varía en función de la concentración inicial ensayada. Así para 50 mg/L se alcanza aproximadamente una biodegradación del 75% al final del ensayo, mientras que 100 mg/L solamente del 50% aproximadamente.

Por tanto la concentración inicial de tensioactivo influye de forma determinante en la velocidad del proceso de biodegradación y en la biodegradación final alcanzada, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos por Jurado (Jurado, 2007), que indica que para los alcoholes grasos etoxilados a bajas concentraciones de ensayo, inferiores a 25 mg/L, la concentración de tensioactivo residual disminuye rápidamente con el proceso de biodegradación y para concentraciones superiores, después de un período de adaptación para los microorganismos, la concentración de tensioactivo disminuye exponencialmente y la velocidad de biodegradación se hace mucho más lenta.

Para analizar la influencia del grado de etoxilación y tamaño de la cadena carbonada sobre la biodegradación primaria, se comparan los dos tensioactivos estudiados, FINDET 1214N/23 y FINDET 1618A/18 (Tabla V.8) a la misma concentración inicial de 50 mg/L.

Observando las curvas obtenidas Figura V.15, se aprecia que se produce la biodegradación preferente del tensioactivo de mayor longitud de cadena alquílica.

Si comparamos con los datos obtenidos por Jurado (Jurado, 2007), en los que se incluye la biodegradación de FINDET 1214N/16 de longitud de cadena C_{12} - C_{14} y grado de etoxilación 4 a 50 mg/L, se observa que la biodegradación alcanzada a 400 horas es de aproximadamente el 55 %. Si comparamos con los resultados obtenidos para FINDET 1214N/23 de igual longitud de cadena y mayor grado de etoxilación (11) a la misma concentración inicial para el que se alcanza el 80% de biodegradación a 400 horas, se puede pensar en que la biodegradación es mayor para los alcoholes grasos etoxilados de mayor grado de etoxilación.

Si consideramos la velocidad de biodegradación como la pendiente de la curva de biodegradación, se puede observar que es mayor para tensioactivos de mayor longitud de cadena, y que influye de forma importante en dicha velocidad la concentración inicial de tensioactivo, siendo considerablemente superior en caso de menor concentración.

La biodegradación está también influenciada simultáneamente por otros parámetros tales como la CMC. En este caso el tensioactivo con menor CMC presenta mayor biodegradabilidad, lo que puede estar relacionado con la baja presencia de tensioactivo libre el cual tiene un efecto inhibitorio en el medio (Jurado, 2007).

5.3.2 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

A fin de poder comparar los diferentes ensayos de biodegradación se han definido una serie de parámetros característicos para los perfiles de biodegradación (Jurado, 2007).

El **tiempo de latencia (t_l)** es el tiempo que tardan en aclimatarse los microorganismos no adaptados al nuevo sustrato; suele corresponder con el periodo de tiempo durante el cual se produce un cambio suave de la concentración residual. Para cada ensayo de biodegradación se calcula trazando dos tangentes a la curva de biodegradación para las etapas de adaptación y biodegradación (Figura V.16). El tiempo de latencia es el punto de corte de ambas rectas.

El período de latencia o aclimatación previo al proceso biodegradativo de compuestos orgánicos en el medio acuático puede tener varias causas tales como la falta de nutrientes, la inducción enzimática, predación por protozoos, mutación de especies, el crecimiento de una población microbiana capaz de metabolizar el sustrato, o simplemente la adaptación a la presencia de agentes tóxicos.

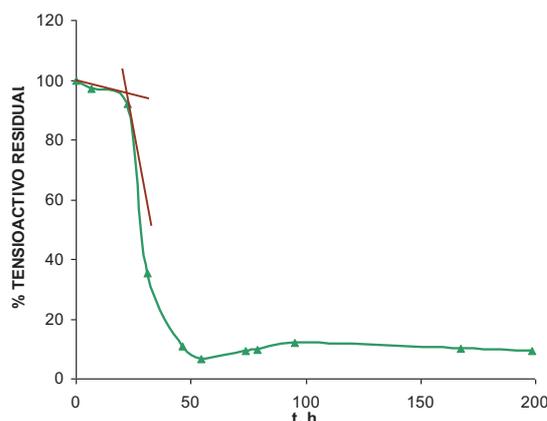


Figura V. 16.- Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación

El **tiempo de vida media ($t_{1/2}$)** es el tiempo para el cual la concentración de sustrato disminuye a la mitad desde el inicio del proceso de biodegradación. Por lo tanto también se contabiliza el tiempo de latencia. Al igual que el tiempo de latencia, el tiempo de vida media se calcula mediante métodos gráficos sobre la curva de biodegradación.

La **Velocidad media de biodegradación (V_M)** se ha calculado como el cociente entre un porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo transcurrido para alcanzar ese valor de biodegradación. Para que los datos procedentes de los diferentes ensayos sean comparables entre sí, se ha fijado un valor de biodegradación del 50 % y se ha medido el tiempo que tarda en alcanzarse dicho valor de biodegradación. Este parámetro puede dar idea de la rapidez con la que está transcurriendo el proceso de biodegradación, además esta velocidad media por unidad de tiempo permite comparar todos los ensayos.

La **concentración de tensioactivo residual (S_R)** es la concentración que no ha sido degradada por los microorganismos, y representa la concentración de tensioactivo que no es metabolizable. Se calcula como el valor medio de la concentración de tensioactivo al final del ensayo cuando ésta permanece prácticamente constante con el tiempo de biodegradación.

La **biodegradabilidad del tensioactivo (B)** se define como el porcentaje de tensioactivo biodegradado a las 50 horas del ensayo.

En la Tabla V.9 se muestran los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para todos los tensioactivos y a todas las concentraciones ensayadas. S_0 es la concentración inicial del ensayo de biodegradación en mg/L y t_T el tiempo total de duración del ensayo en horas.

Tabla V. 9.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE

FINDET 1214N/23						
S_0 , mg/L	t_T , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L
50	1366.50	46.00	0.00	60.71	0.84	9.22
100	1366.50	1.00	25.00	839.29	0.06	44.56
FINDET 1618A/18						
S_0 , mg/L	t_T , h	B, %	t_L , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L
50	1366.50	46.00	39.30	57.14	0.89	0.33

De los parámetros obtenidos se puede observar como la velocidad media de biodegradación es muy inferior en caso de altas concentraciones, esto indica que, a medida que aumenta la concentración, la biodegradación se ralentiza, lo que puede ser debido a la autoinhibición provocada por el efecto bacteriostático del sustrato (Jurado, 2007).

En el caso de los parámetros B, V_M y S_R , al aumentar la concentración disminuye la biodegradabilidad y la velocidad media de biodegradación, y aumenta la concentración de tensioactivo residual tal y como era esperado.

5.3.3 CRECIMIENTO DE LA BIOMASA DURANTE EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

Durante el proceso de biodegradación primaria los microorganismos actúan sobre el tensioactivo, que es la única fuente de carbono presente en el medio, y lo transforman de acuerdo con la siguiente reacción:



Es decir, los microorganismos actúan sobre la molécula de tensioactivo, la rompen y la transforman en biomasa y en subproductos de degradación con desprendimiento de CO₂.

Las curvas de crecimiento de microorganismos son un método alternativo para evaluar la biodegradabilidad total o última de los tensioactivos cuando éstos son la única fuente de carbono en el medio de cultivo.

Durante el ensayo de biodegradación se ha utilizado como inóculo una población aireada y mixta de microorganismos no adaptados procedentes de una EDAR que opera con aguas residuales urbanas.

Las curvas de crecimiento se obtuvieron simultáneamente a los perfiles de biodegradación primaria de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2. La concentración de microorganismos se expresa como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Las curvas de crecimiento presentan cuatro fases más o menos diferenciadas que se corresponden con las fases de crecimiento microbiano en reactores discontinuos:

1. Fase de retardo o aclimatación, que algunos autores definen como el tiempo durante el cual se consume menos del 10% del sustrato inicial presente en el ensayo de biodegradación. En esta fase de aclimatación apenas existe crecimiento de la población microbiana.
2. Fase de crecimiento exponencial durante la cual la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar el sustrato.
3. Fase estacionaria en la que la población: a) ha agotado el sustrato o nutrientes necesarios para su crecimiento, b) existe un equilibrio entre crecimiento y muerte de células.

- Fase de muerte o crecimiento decreciente. La concentración de sustrato disponible es muy baja y los microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin reposición del mismo. La tasa de muerte de microorganismos excede de la población de células nuevas.

En las Figuras V.17 y Figura V.18 se muestran las curvas de crecimiento para cada uno de los tensioactivos y a las concentraciones ensayadas. Se presenta una gráfica (Figura V.17) con las curvas de crecimiento para el mismo tensioactivo a diferentes concentraciones con objeto de estudiar la influencia de la concentración inicial y otra gráfica (Figura V.18) a la misma concentración inicial pero diferente tensioactivo, con objeto de estudiar la influencia la longitud de cadena y grado de etoxilación del tensioactivo.

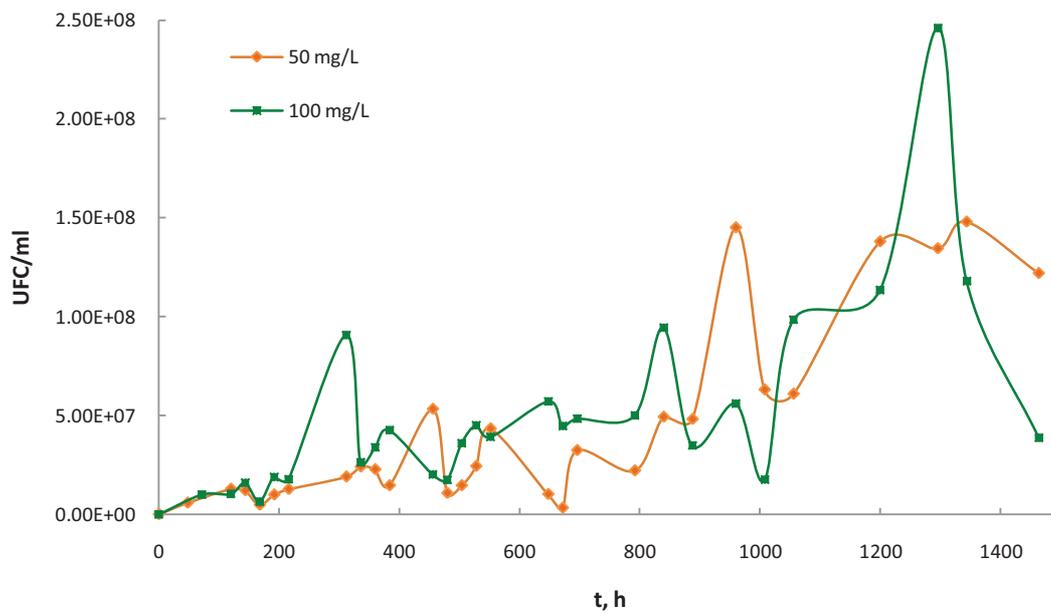


Figura V. 17.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para FINDET 1214N/23 a 50 mg/L y 100 mg/l de concentración inicial

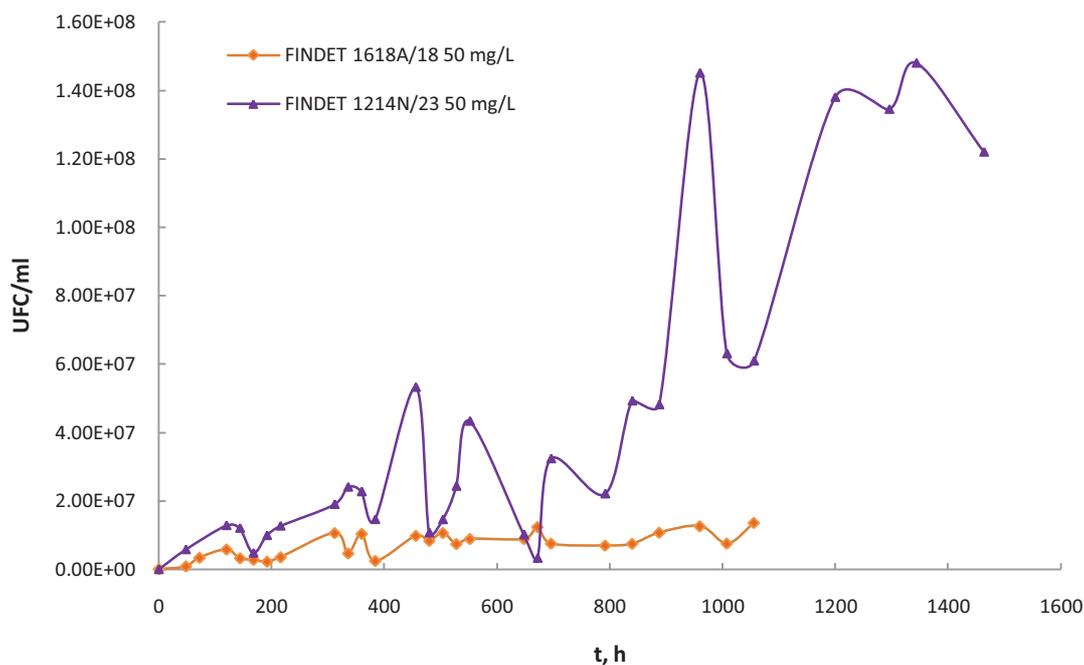


Figura V. 18.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los tensioactivos FINDET 1214N/23 y FINDET 1618A/18 a 50 mg/L de concentración inicial

De la figura V.17 se puede observar que para la mayor concentración de tensioactivo, en la 2ª fase de la curva de crecimiento en la que tiene lugar el crecimiento de la población exponencial, se alcanza mayor número de unidades formadoras de colonias. Por otra parte para el tensioactivo de mayor grado de etoxilación y de menor longitud de cadena, FINDET 1214N/23, se obtienen valores mayores de UFC/ml (Figura V.18).

En la figura V.19, V.20 y V.21 se representan las curvas de crecimiento junto con los perfiles de biodegradación primaria correspondiente.

Durante la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos se produce una disminución lineal en la concentración de tensioactivo residual, cuando la concentración de tensioactivo comienza a permanecer constante se observa que el número de UFC oscila también sobre un valor constante. Finalmente a tiempos más elevados, con el tensioactivo agotado o con un valor de concentración constante se produce un incremento en las UFC, lo que se puede interpretar como inhibición de los microorganismos existentes inicialmente en el ensayo y crecimiento de nuevas poblaciones debido a la biodegradación de los subproductos de biodegradación.

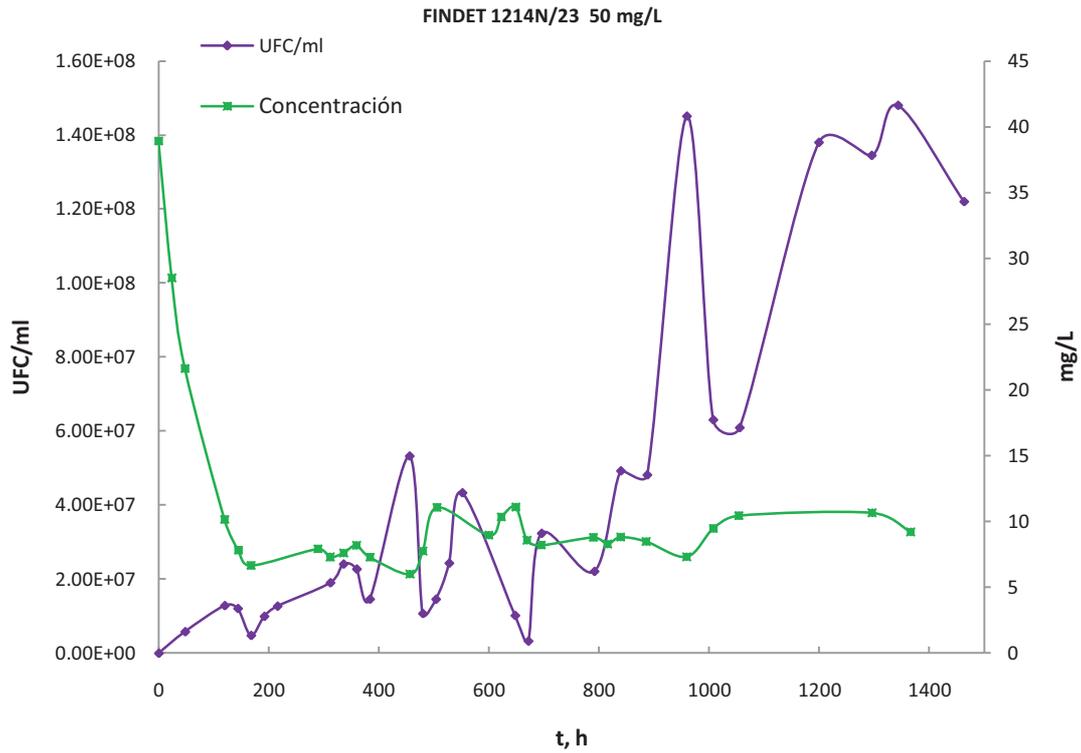


Figura V. 19.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1214N/23 con concentración inicial de 50 mg/L

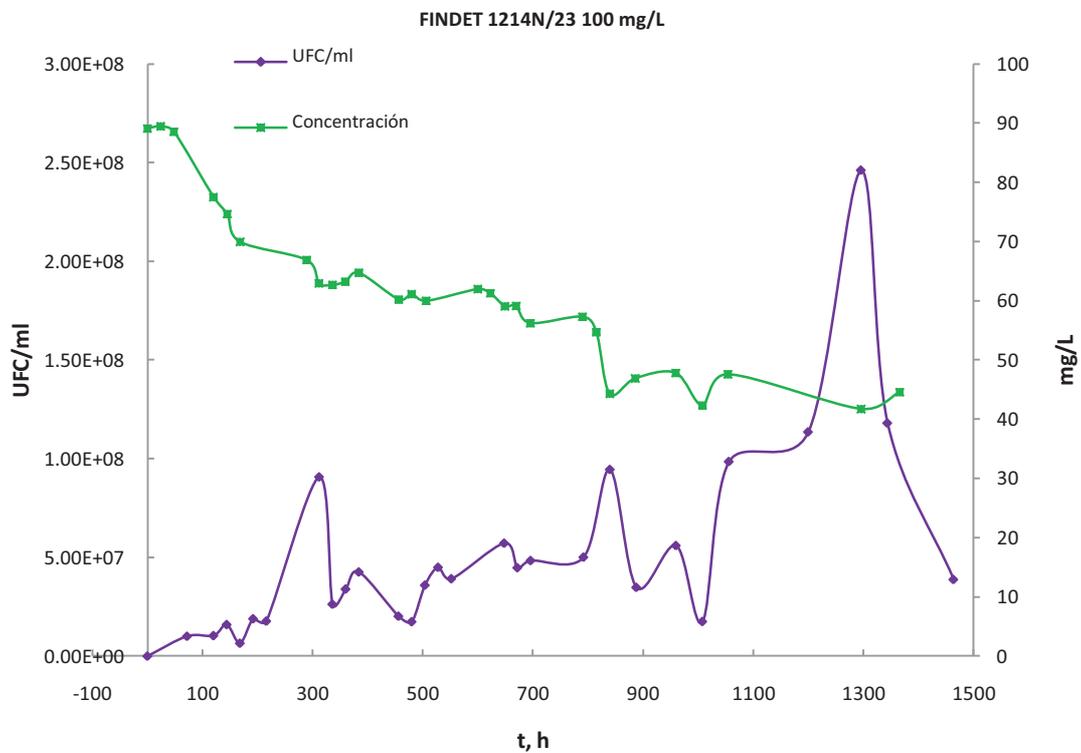


Figura V. 20.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1214N/23 con concentración inicial de 100 mg/L

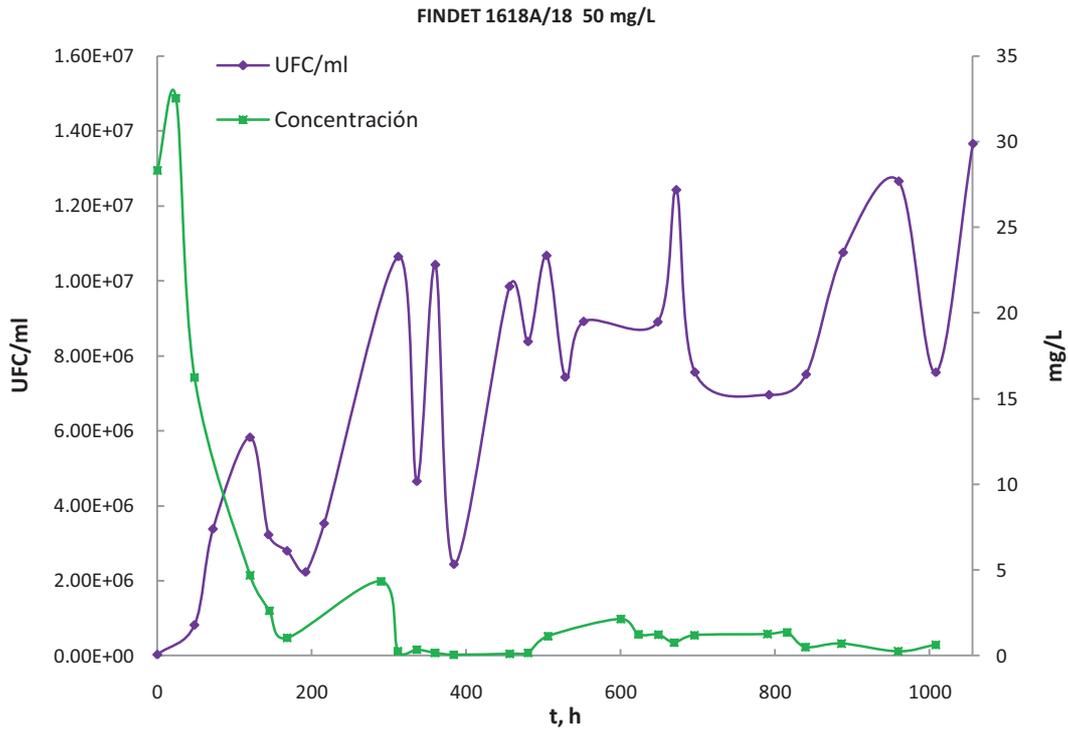


Figura V. 21.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1618A/18 con concentración inicial de 50 mg/L

5.3.4 PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO

En la Tabla V.10 se muestran los parámetros característicos de las curvas de crecimiento durante el proceso de biodegradación: X_0 es el valor inicial de UFC/ml obtenido en el ensayo; UFC/ml_{max} representa el valor máximo de UFC/ml que aparecen en la primera fase de crecimiento exponencial (primer pico). Se observa que UFC/ml_{max} aumenta con la concentración cuando el número de moles de OE de la molécula de tensioactivo es bajo, para número de moles de OE mayor el crecimiento se inhibe con la concentración, aparecen nuevas unidades formadoras de colonias responsables de la degradación de los metabolitos de biodegradación.

El crecimiento microbiano durante la fase primaria de crecimiento exponencial puede describirse mediante la ecuación de Monod de acuerdo con la siguiente expresión (Jurado, 2007):

$$\frac{dX}{dt} = k \cdot x$$

Ecuación V.7

o en su forma integrada:

$$X = X_0 \cdot \exp(k \cdot t)$$

Ecuación V. 8

Donde k representa la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} , X la concentración de biomasa en cada instante expresada como UFC/ml, y X_0 la concentración de biomasa al inicio del ensayo.

Mediante regresión no lineal ajustando los datos a la ecuación de Monod en su forma integrada ecuación V.8, se ha determinado la velocidad específica de crecimiento. (Tabla V.10)

También se ha calculado el parámetro Y_{ap} , que representa el rendimiento de producción de biomasa, es decir: la proporción de sustrato original convertido en biomasa, el cual se asume constante a lo largo del proceso de biodegradación. A partir de los perfiles de biodegradación del sustrato y de las curvas de crecimiento se calcula Y_{ap} como el cociente $\Delta X/\Delta S$, donde ΔX es la cantidad de microorganismos formados durante la fase de crecimiento exponencial y ΔS la cantidad de sustrato consumido durante el mismo período de tiempo.

Tabla V.10.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento de biomasa para AGE

FINDET 1214N/23				
S_0 , mg/L	X_0 , UFC/ml	UFC/ml _{max}	k , h ⁻¹	Y_{ap} , UFC/g sustrato
50	$7.11 \cdot 10^3$	$1.29 \cdot 10^7$	0.0584	$4.47 \cdot 10^{11}$
100	$1.06 \cdot 10^4$	$1.60 \cdot 10^7$	0.0529	$1.05 \cdot 10^{12}$
FINDET 1618A/18				
S_0 , mg/L	X_0 , UFC/ml	UFC/ml _{max}	k , h ⁻¹	Y_{ap} , UFC/g sustrato
50	$3.07 \cdot 10^4$	$5.82 \cdot 10^6$	0.0457	$2.44 \cdot 10^{11}$

Según los parámetros obtenidos, la velocidad específica de crecimiento no se ve fuertemente afectada por la concentración inicial de tensioactivo y sí por el tipo de tensioactivo, obteniéndose menor velocidad para el de mayor longitud de cadena y menor grado de etoxilación, FINDET 1618A/18. En cuanto al rendimiento de producción de biomasa, se ve incrementado por el aumento en la concentración de tensioactivo, y es menor para el tensioactivo de mayor longitud de cadena.

Para la misma concentración de tensioactivo (50 mg/L), Y_{ap} es menor para el tensioactivo de menor CMC, debido a la formación de micelas y por lo tanto la baja presencia de tensioactivo libre en el medio.

5.4 BIODEGRADABILIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL

Los LAS son uno de los tensioactivos más estudiados, sobre todo en aspectos relacionados con su biodegradabilidad primaria y total. Alguno de los motivos por los que los LAS han alcanzado tanta importancia son, entre otros: la preocupación acerca de que el anillo bencénico de la molécula pueda ser biorresistente y acumularse en el agua, y por lo tanto que el compuesto no sea totalmente biodegradable, y además el elevado volumen que este tensioactivo alcanza en el medio natural.

En la Tabla V.11 se recogen los resultados obtenidos por diversos autores para ensayos de fácil biodegradabilidad en los que se emplean medios sintéticos con concentraciones de inóculo relativamente bajas (10^2 - 10^3 bacterias/ml). El porcentaje de biodegradación se ha calculado midiendo la concentración de tensioactivo residual como MBAS.

Tabla V. 11.- Algunos resultados de biodegradación de LAS en ensayos con medio sintético y bajas concentraciones de inóculo (Perales, 2001)

Compuesto	S ₀ (mg/L)	% Biodeg.	t, días	Referencia
LAS	5	100*	7	Swisher (1966)
JNQ sulfonato	15	90-97	10	Painter (1978)
JNQ sulfonato	20	75	8	Brown (1976)
Marlon A	20	99 93	28 7	Brown (1976)
LAS	5	100	21	Sengul (1980)
LAS	(2 - 5)	91 96	5 10	Hrsak (1981)
C ₁₂ -LAS	30	95	5	Kravetz (1982)
C ₁₃ -LAS	30	95	28	Kravetz (1982)
LAS	5.5	95	28	Gerike (1987)
LAS	32	99	4	Boatman (1986)

* sin adición de inóculo en un medio no esterilizado. Marlon A: mezcla comercial de homólogos de LAS.

Incluso en ausencia de inóculo, Swisher (Swisher, 1966) encontró que el 100% de MBAS fue eliminado en 7 días con una concentración inicial de LAS de 5 mg/L, sólo con los microorganismos que puedan pasar al reactor provenientes de la atmósfera. Los grados de biodegradación más elevados (99% en 4 días) se deben probablemente a la preaclimatación del inóculo y a que la concentración de éste es mucho más elevada que para el resto de ensayos.

El LAS se ha empleado en esta investigación como patrón blando por sus características de biodegradabilidad. Sólo se aceptan como válidos aquellos ensayos en los que la biodegradación del LAS ha sido mayor del 90% a los cinco días del ensayo (apartado 3.2.1.6.), (UNE 55-844-91).

Para el estudio de la biodegradabilidad primaria del LAS se ensayo una concentración inicial 5 mg/L mediante el ensayo estático (apartado 3.2.1). El seguimiento de la biodegradación se realizó aplicando el método simplificado de análisis para determinación de tensioactivos aniónicos (MBAS) (Jurado, 2006).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.22 donde, para su comparación, la concentración de tensioactivo se ha expresado como tanto por ciento de tensioactivo residual.

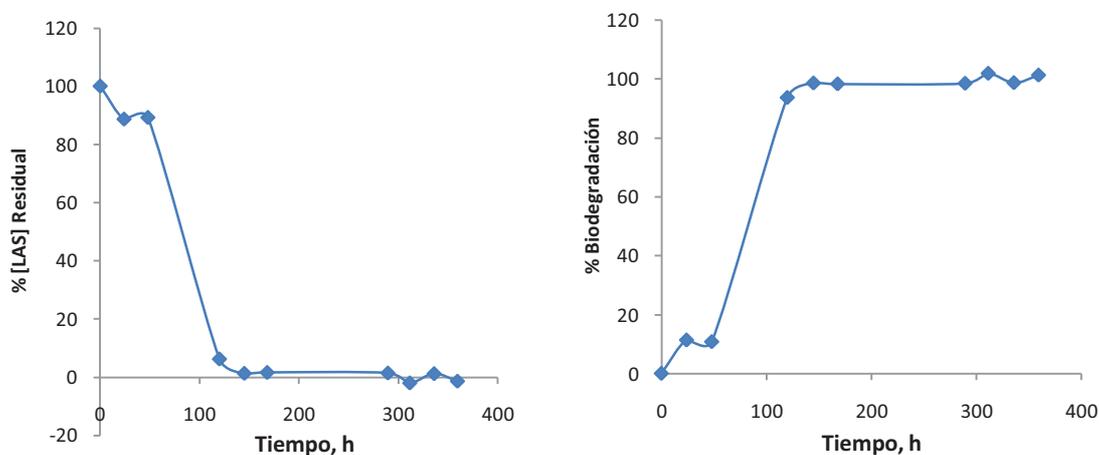


Figura V. 22.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación para el LAS, 5 mg/L

En la figura puede observarse que para tiempos relativamente cortos el LAS ha sido biodegradado prácticamente en su totalidad. A los 5 días del ensayo (120 horas), el % de LAS residual es de 6.28 %, lo que supone que se ha producido la biodegradación del 93.72%, por tanto es aceptable como patrón blando según (UNE 55-844-91).

En la Tabla V.12 se presentan los parámetros característicos del perfil de biodegradación.

Tabla V.12.- Parámetros característicos para el perfil de biodegradación del LAS

LAS						
S_0 , mg/L	t_r , h	B, %	t_i , h	$t_{1/2}$, h	V_M , %/h	S_R , mg/L
5	359.5	13.0	46.15	82.69	0.6111	0.054

5.5 TOXICIDAD DE TENSIOSACTIVOS

Los tensioactivos son compuestos que actúan en las interfases de los fluidos y su estructura bipolar les permite interactuar con las superficies celulares y con las membranas biológicas en general, causando efectos sobre la tensión superficial y la movilización de moléculas entre los medios extra e intracelular.

Desde el punto de vista toxicológico los efectos de los tensioactivos a largo plazo no son bien conocidos, aunque sí se sabe que pueden provocar irritaciones en la piel y órganos internos, efectos depresivos, etc.

En la actualidad es muy importante conocer y estudiar la toxicidad de los tensioactivos para decidir sobre su inclusión en la formulación de compuestos químicos, y especialmente en unos de los campos de mayor aplicación, la formulación de detergentes. Su utilización en este campo supone que sean eliminados en las aguas residuales y/o superficiales pasando así al medio acuático, por lo que es imprescindible estudiar el comportamiento y toxicidad en este medio.

Una gran variedad de bioensayos son adecuados para establecer los niveles de toxicidad de compuestos para organismos acuáticos, pero la mayoría de ellos precisan de tiempos elevados y no son rutinariamente aplicables. Además, el uso de formas de vida superiores puede suponer procedimientos no del todo éticos. Por tanto, hay necesidad de reemplazar los ensayos de toxicidad aguda en peces por otros ensayos más efectivos.

Aunque varios bioensayos que utilizan microorganismos han sido descritos, la mayoría de los test con bacterias están basados en medida de la luminiscencia, porque de esta manera son rápidos, reproducibles, y simples de usar, además de que no suponen problemas éticos y su coste es relativamente bajo (Farré, 2001). Las características de rapidez, fiabilidad, y normalización de los resultados de toxicidad mediante bioensayos con bacterias luminiscentes, los hace ideales para la unificación de datos de toxicidad, los cuales pueden ser comparados y estadísticamente estudiados para establecer correlaciones entre toxicidad así como la estructura química y/o diferentes propiedades de los compuesto ensayados.

Los ensayos con bacterias luminiscentes están ganando una gran aceptación por la determinación rápida y simple de la toxicidad de compuestos químicos en aguas superficiales y residuales. Esto explica el hecho de que junto con los ensayos con *Daphnia magna*, estén incluidos en una lista de bioensayos aprobados para caracterizar tóxicos y vertidos peligrosos.

En este estudio se utiliza el ensayo LumiStox, este tipo de ensayo presenta una gran simplicidad de operación, es un ensayo rápido y muy estandarizado, lo que permite la comparación fidedigna de datos de toxicidad, además es un ensayo que da una buena correlación con resultados obtenidos con otros bioensayos más complicados y costosos .

El ensayo LumiStox® conforme a la norma NORMA UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN ISO 11348-2), utiliza bacterias luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri* como microorganismos de prueba (apartado 3.4.1). Estas bacterias no patógenas emiten luz como mecanismo de liberación de energía en el curso de su metabolismo normal. La intensidad de luz emitida es, por tanto, una medida de la actividad metabólica de las bacterias. Cuando estos microorganismos están expuestos a una muestra tóxica, la emisión de luz disminuye de forma proporcional a la toxicidad de la muestra. Por tanto es un ensayo basado en la inhibición de la actividad enzimática de la luciferina, que es la enzima responsable de la bioluminiscencia en estas bacterias.

De forma general, el uso de los datos de toxicidad se ha extendido a invertebrados y peces, considerándolos más importantes y representativos que ensayos de toxicidad con productores primarios, ya que los primeros son más sensibles a toxinas.

El ensayo con *Daphnia magna* ha resultado ser también un modelo simple y sensible para la determinación de toxicidad (Sandbacka, 2000).

Por ello también se realizan medidas de toxicidad utilizando microcrustáceos *Daphnia magna* (apartado 3.4.2), en el que se mide la inmovilización de los organismos tras 24 horas de exposición con el tóxico de acuerdo con la norma UNE-EN ISO 6431:1996 (UNE EN ISO 6431, 1996) y OECD Guideline 202 (OECD, 1984a).

Algunos estudios (Rang G. 1995), han mostrado que en determinados casos, las plantas son mucho más sensibles, por ejemplo en ensayos con metales, efluentes industriales, pesticidas y tensioactivos catiónicos.

Las algas constituyen el primer nivel de la cadena trófica y son los proveedores de oxígeno en el medio acuático, además son usados como indicadores in-situ de la calidad de las aguas (Sibila, 2008b), lo que supone que el estudio de la toxicidad con ellas sea de vital importancia para la preservación del medio ambiente. Por ello y para los continuos avances en las investigaciones entre la relación entre toxicidad y parámetros estructurales en el campo de los tensioactivos, en el presente estudio también se determina la toxicidad con microalgas *Selenastrum capricornutum* (apartadao 3.4.3). En este ensayo de mide la inhibición del

crecimiento de algas tras 72 horas de exposición con el tóxico de acuerdo con y de acuerdo con la UNE-EN ISO 28692 (UNE EN ISO 28692) y OCED Guideline 201 (OECD, 1984b).

5.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE IC₅₀, EC₂₀ Y EC₅₀

La determinación de la toxicidad se realizó para distintos tipos tensioactivos: ácidos alquil éter carboxílicos, alquilpoliglucósidos, óxidos de amina, ésteres de glicerina polietoxilados y alquilbenceno sulfonato lineal.

– **Bacterias Luminiscentes:** El valor de la toxicidad se mide como EC₅₀ y EC₂₀ que son, respectivamente, la concentración de tensioactivo en mg/L que produce una inhibición del 50% y del 20% después de 15 y 30 minutos de exposición con el tóxico. Los valores de EC₅₀ y EC₂₀ se calculan dando a la función Gamma, función que evalúa las relaciones concentración-efecto, los valores 1 y 0.25, respectivamente (apartado 3.4.1.3.4.). Esta función Gamma es un indicador de la inhibición enzimática, más correcto y exacto que el simple porcentaje de disminución de luz. Los valores de EC₅₀ y EC₂₀ dependen de la temperatura, del tiempo de exposición y, principalmente, de la naturaleza química de los contaminantes en la muestra. Los ensayos se han realizado a una temperatura de 15 °C.

La relación lineal entre la función Γ y la concentración de tensioactivo empleado viene dada por:

$$\log(C) = b \cdot \log(\Gamma) + \log(a)$$

Ecuación V.9

– **Daphnia magna:** El valor de la toxicidad se mide como IC₅₀, que representa la concentración a la que se produce la inmovilización del 50% de la población de Daphnias. El cálculo se realiza representando el logaritmo de la concentración de tensioactivo en función del % de efecto. En dicha representación los datos se pueden ajustar a una línea recta mediante el método de mínimos cuadrados, de forma que:

$$\log[\text{tensioactivo}] = A \cdot \% \text{ efecto} + B$$

Ecuación V. 10

Evaluando para 50% de efecto se obtiene el valor para IC₅₀.

- **Microalgas, *Selenastrum capricornutum***: El valor de la toxicidad se mide como EC_{50} , que representa la concentración a la que se produce el 50% de la inhibición del crecimiento. El cálculo se realiza representando el logaritmo de la concentración de tensioactivo en función del % de inhibición (γ). En dicha representación los datos se pueden ajustar a una línea recta mediante el método de mínimos cuadrados, de forma que:

$$\log[\text{tensioactivo}] = A \cdot \% \gamma + B$$

Ecuación V. 11

Evaluando para 50% de tasa de Inhibición se obtiene el valor para EC_{50} .

5.5.2 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

Para los ácidos alquil éter carboxílicos se han realizado ensayos de toxicidad con bacterias luminiscentes, *Daphnia magna* y Microalgas. Los tensioactivos utilizados en este estudio son tensioactivos aniónicos pertenecientes a la serie AKYPO® de Kao-Corporation, AKYPO® LF1, AKYPO® LF2, AKYPO® LF4, AKYPO® LF6, AKYPO® RLM-25 y AKYPO® RLM-100.

Las principales propiedades se muestran en la tabla V.13, donde se indican la longitud de la cadena (R), el grado de etoxilación (n), el tanto por ciento de materia activa y la concentración micelar crítica (CMC).

Tabla V.13: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	R	n	% Materia Activa	CMC, mg/L
AKYPO® RLM 25	Laureth-4 Carboxylic Acid	C12-C14	≈3	≈ 94	23.30
AKYPO® RLM 100	Laureth-11 Carboxylic Acid	C12-C14	10	≈ 90	41.80
AKYPO® LF1	Capryleth-6 Carboxylic Acid	C8	5	≈ 90	102.5
AKYPO® LF2	Capryleth-9 Carboxylic Acid	C8	8	≈ 89	257.8
AKYPO® LF4	Capryleth-9 Carboxylic Acid + Hexeth-4 Carboxylic Acid	C6-C8	8-3	≈ 89	563.4
AKYPO® LF6	Capryleth-9 Carboxylic Acid + Buteth-2 Carboxylic Acid	C4-C8	8-1	≈ 87	1442.3

5.5.2.1 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

La Figura V.23 muestra las linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para los tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos. Los puntos representan los resultados experimentales (valor medio de dos réplicas) y la línea el ajuste de la Ecuación V.9 a los datos.

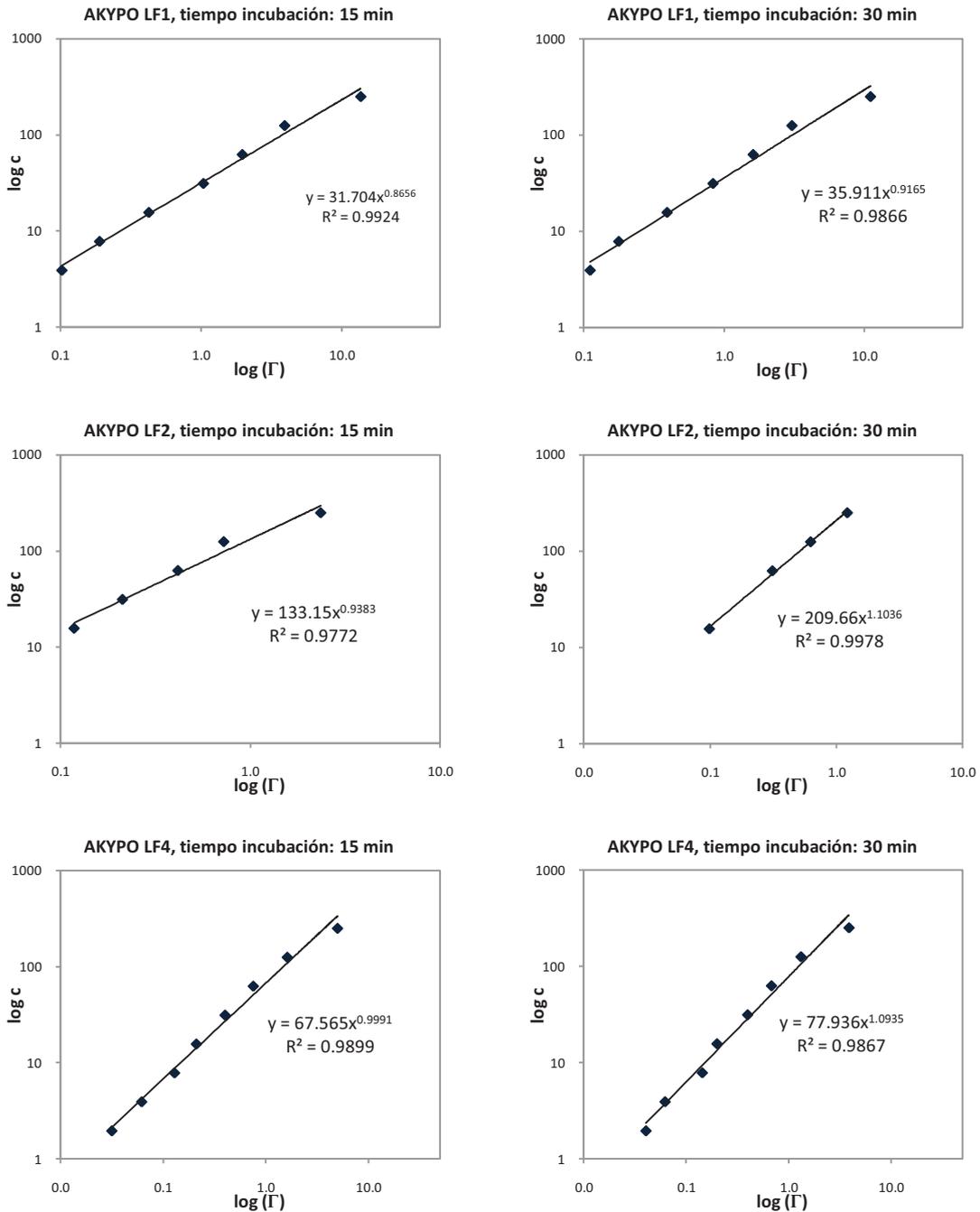


Figura V.23.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos AKYPO

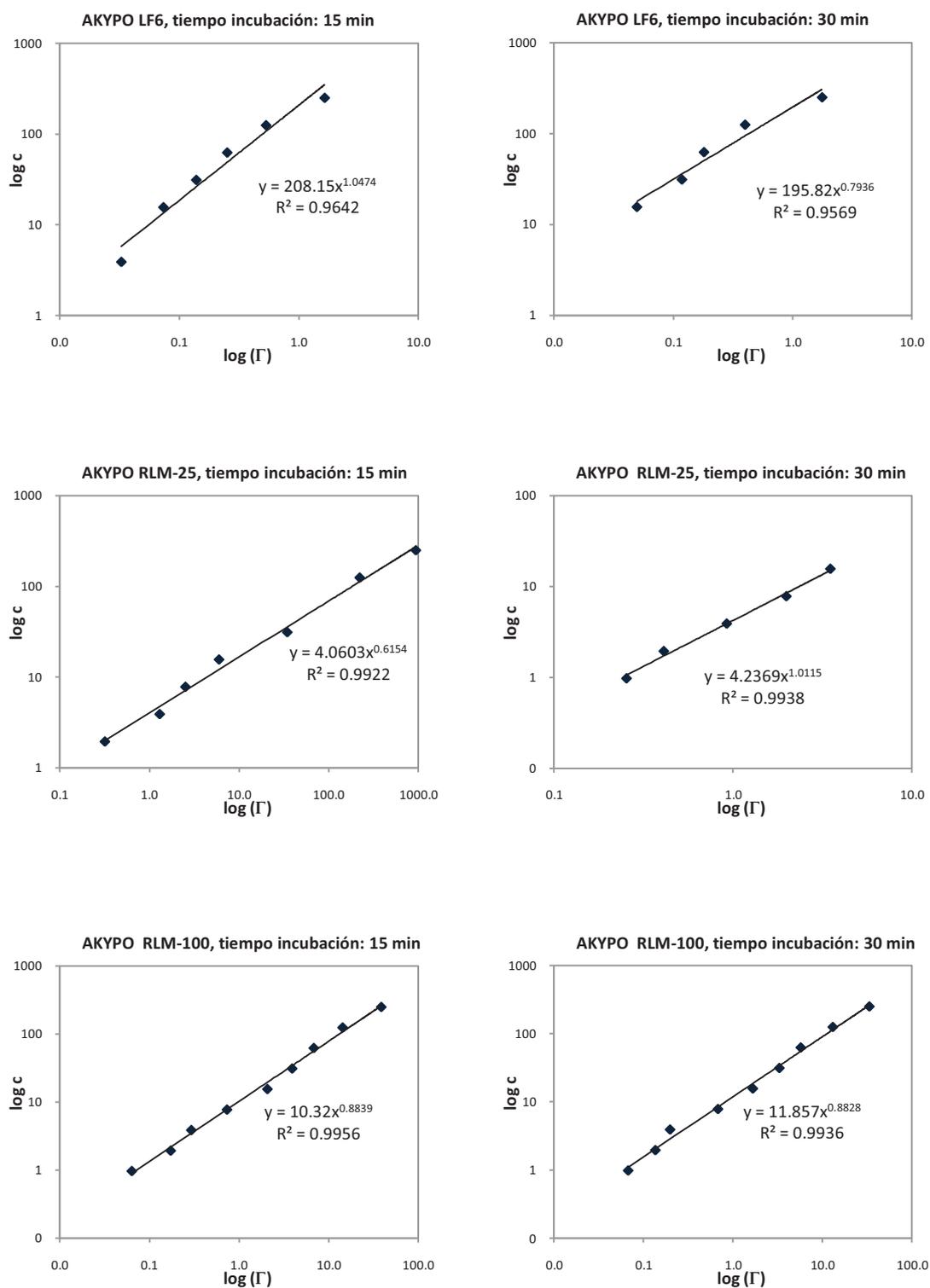


Figura V.23 (Continuación).-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos AKYPO

Los resultados de EC_{50} y EC_{20} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.14 y en la Figura V.24 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.14.-Datos de EC_{50} y EC_{20} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

TOXICIDAD AKYPOS (mg/L)				
TENSIOACTIVO	EC 20 BACT (15 min)	EC 50 BACT (15 min)	EC20 BACT (30 min)	EC 50 BACT (30 min)
AKYPO RLM-25	0.424	3.582	1.909	4.744
AKYPO RLM-100	4.512	14.185	4.392	15.199
AKYPO LF1	10.018	32.760	11.988	39.244
AKYPO LF4	15.103	65.748	15.927	75.087
AKYPO LF2	22.935	134.597	36.442	181.652
AKYPO LF6	63.546	211.050	83.750	217.325

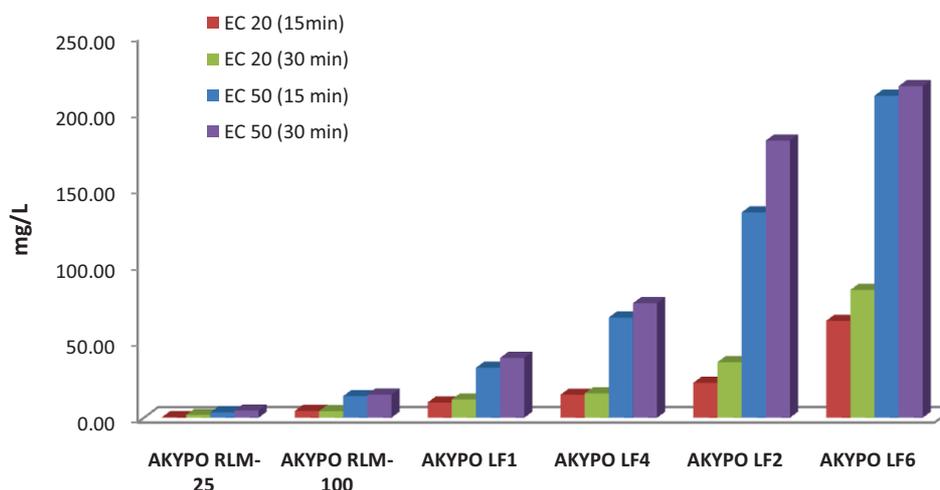


Figura V.24.-Datos de EC_{50} y EC_{20} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

5.5.2.2 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍlicos CON *DAPHNIA MAGNA*

En la Figura V.25 se muestran las linealizaciones del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo obtenidas después de 24 horas de incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

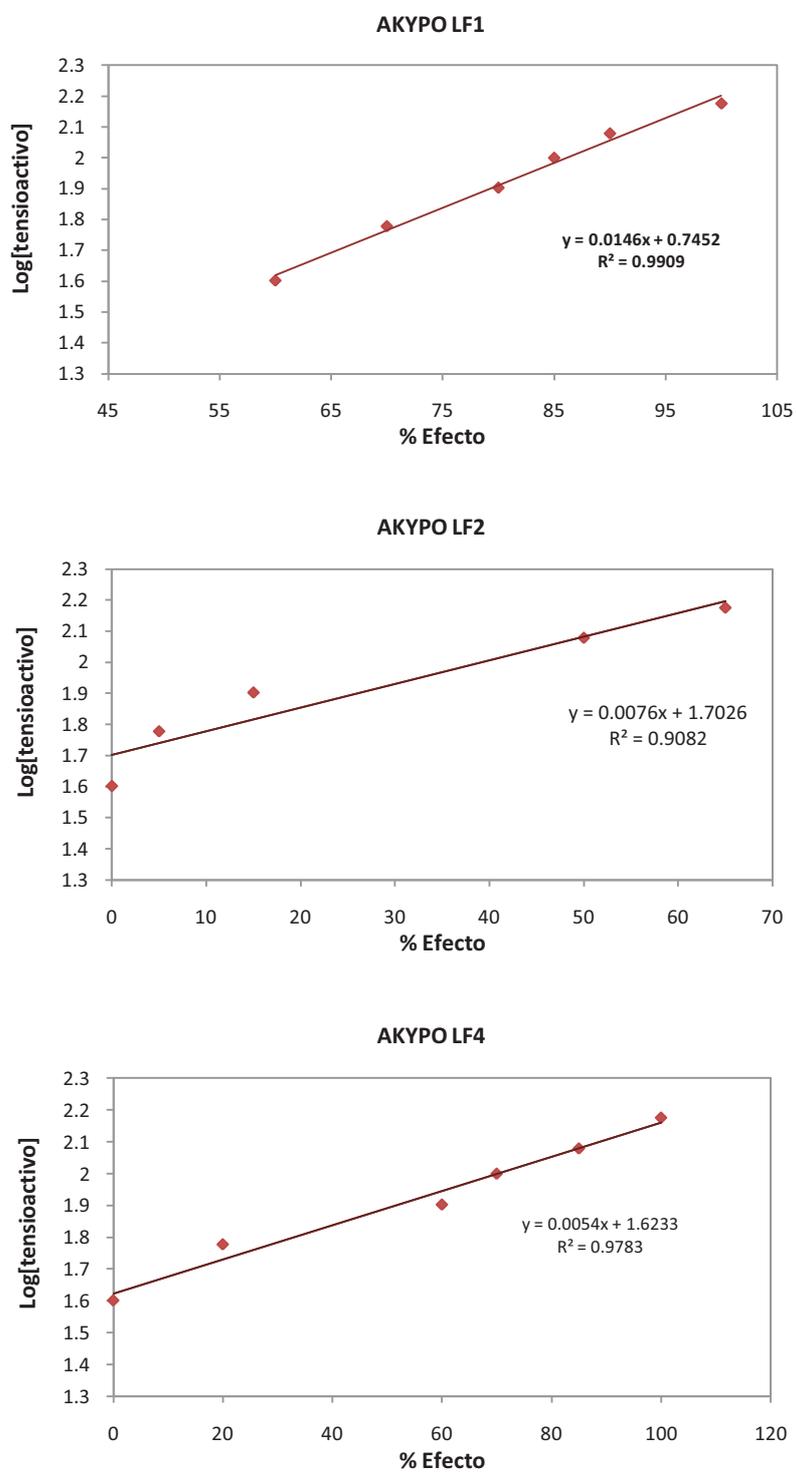


Figura V.25.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

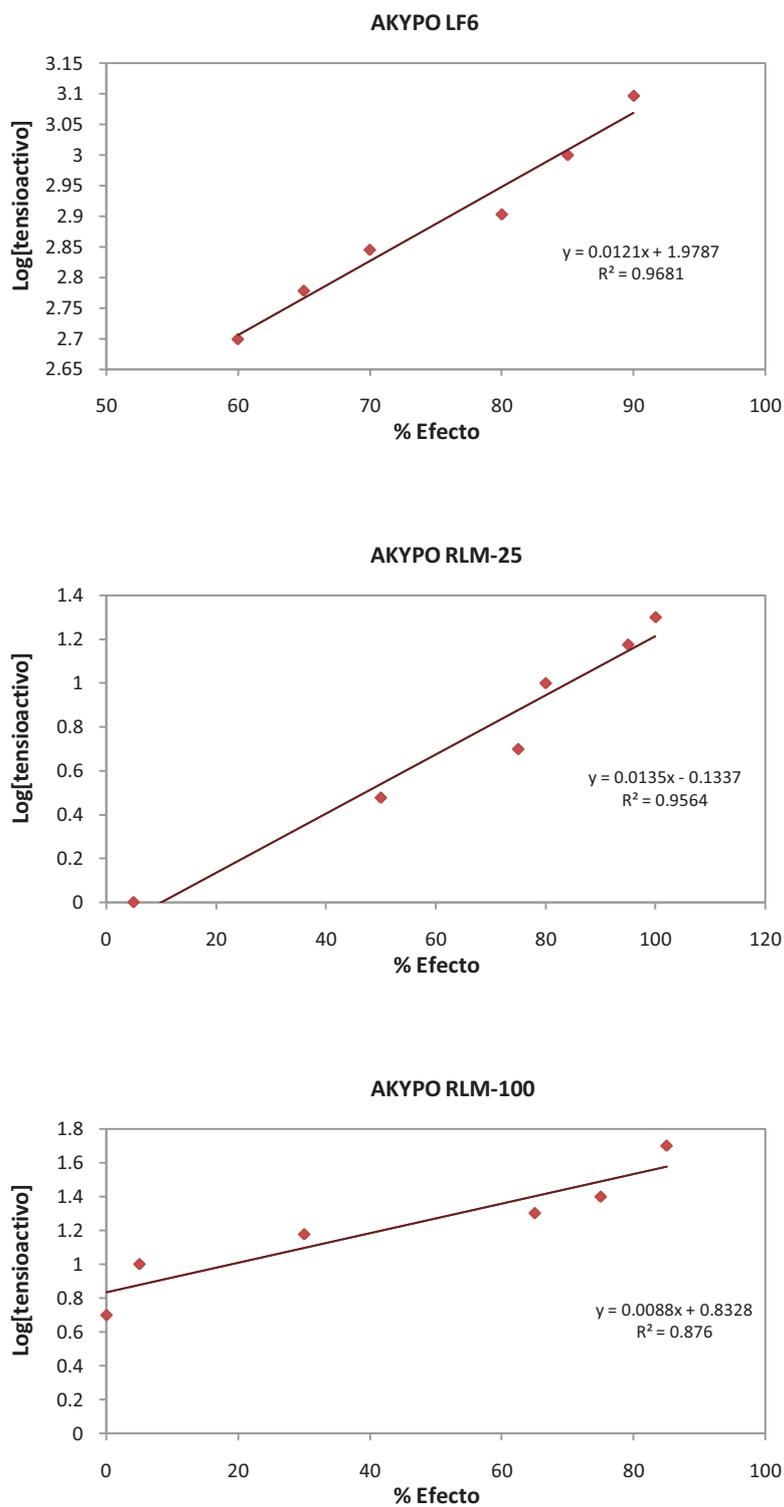


Figura V.25 (Continuación).-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.15 y en la Figura V.26 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.15.-Datos de IC_{50} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con *Daphnia magna*

TOXICIDAD AKYPOS®	
TENSIOACTIVO	IC_{50} , mg/L
AKYPO RLM-25	3.478
AKYPO RLM-100	18.74
AKYPO LF1	29.87
AKYPO LF4	78.22
AKYPO LF2	120.95
AKYPO LF6	383.44

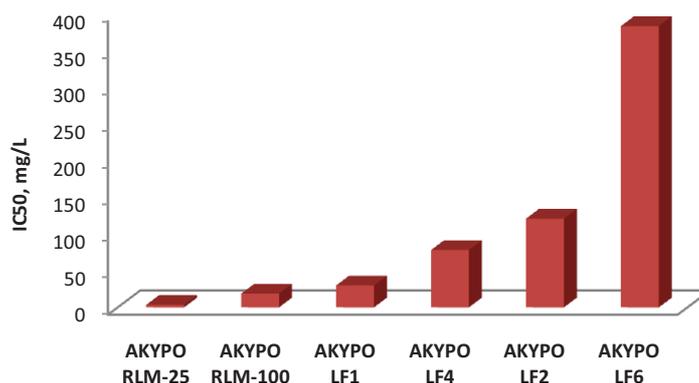


Figura V.26.-Datos de IC_{50} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con *Daphnia magna*

5.5.2.3 TOXICIDAD DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON MICROALGAS

En la Figura V.27 se muestran las linealizaciones del % de inhibición del crecimiento y la concentración de tensioactivo obtenidas después de 72 horas de incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.11 a los datos.

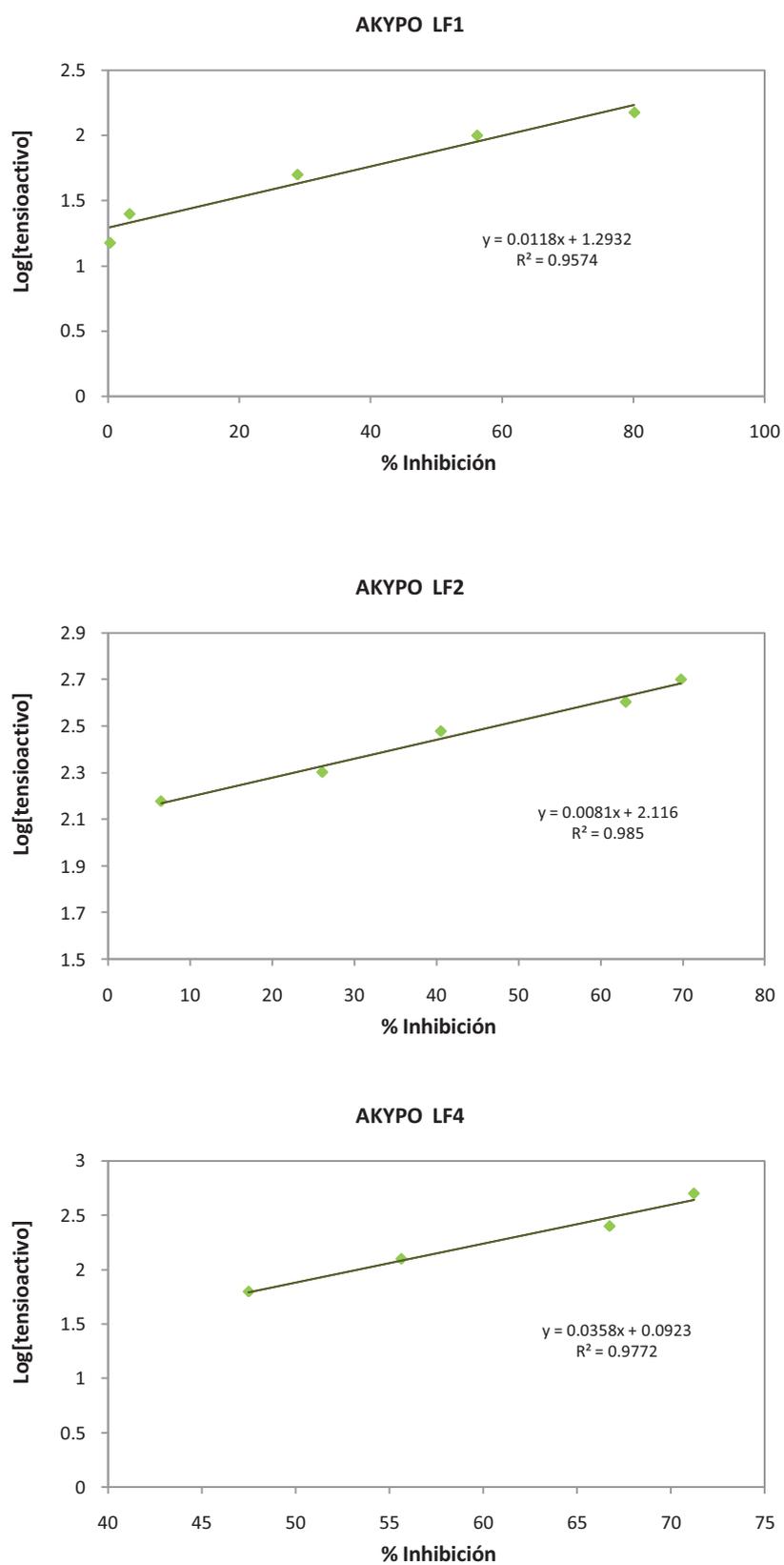


Figura V.27.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

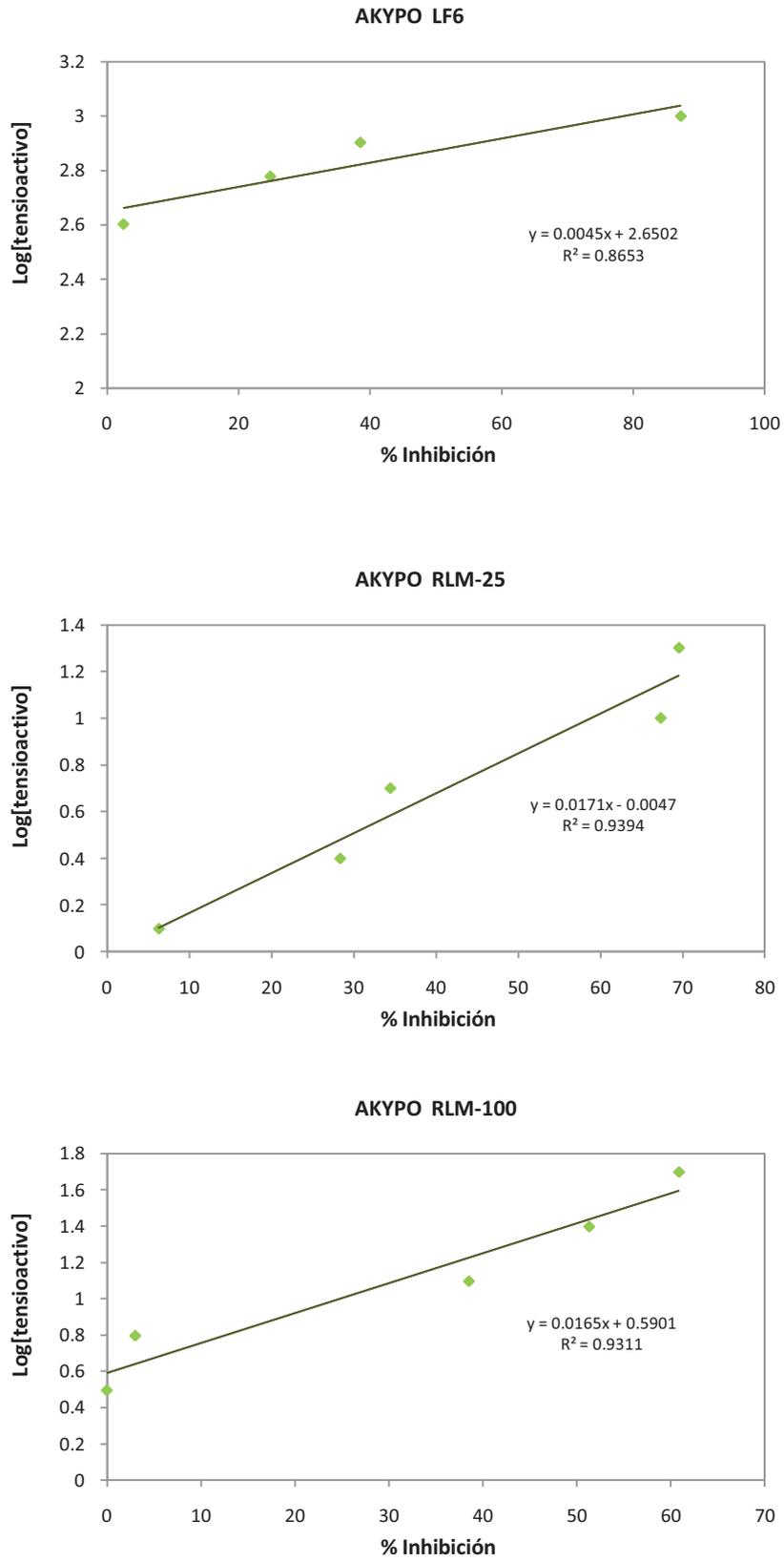


Figura V.27 (Continuación).-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

Los resultados de EC_{50} obtenidos a partir de las gráficas anteriores y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.16 y en la Figura V.28 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.16.-Datos de IC_{50} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas

TOXICIDAD AKYPOS	
TENSIOACTIVO	EC_{50} , mg/L
AKYPO RLM-25	7.08
AKYPO RLM-100	26.01
AKYPO LF2	76.26
AKYPO LF1	76.42
AKYPO LF4	331.89
AKYPO LF6	750.24

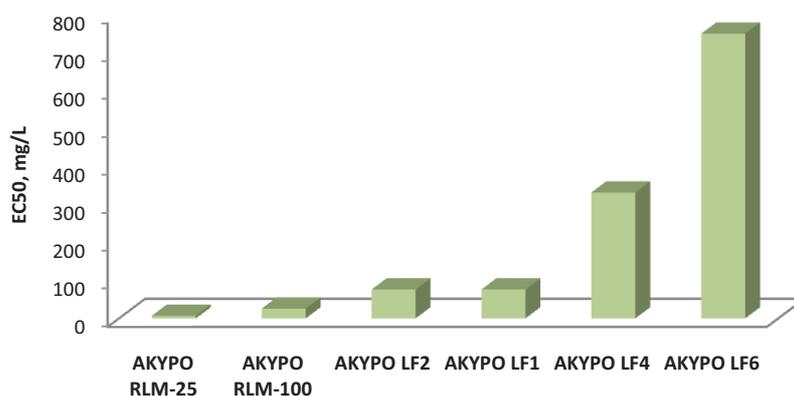


Figura V.28.-Datos de EC_{50} para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas

A continuación en la Tabla V.17, y en la figura V.29 se muestran a modo de resumen todos los datos de toxicidad obtenidos para los ácidos alquieltercarboxílicos con los tres métodos de ensayo en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.17.-Resumen datos de toxicidad para ácidos alquil éter carboxílicos

TENSIOACTIVO	EC_{50} o IC_{50} mg/L		
	EC_{50} BACT (15 min)	DAPHNIA	ALGAS
AKYPO RLM-25	3.58	3.478	7.08
AKYPO RLM-100	14.19	18.74	26.01
AKYPO LF1	32.76	29.87	76.42
AKYPO LF4	65.75	78.22	331.89
AKYPO LF2	134.60	120.95	76.26
AKYPO LF6	211.05	383.44	750.24

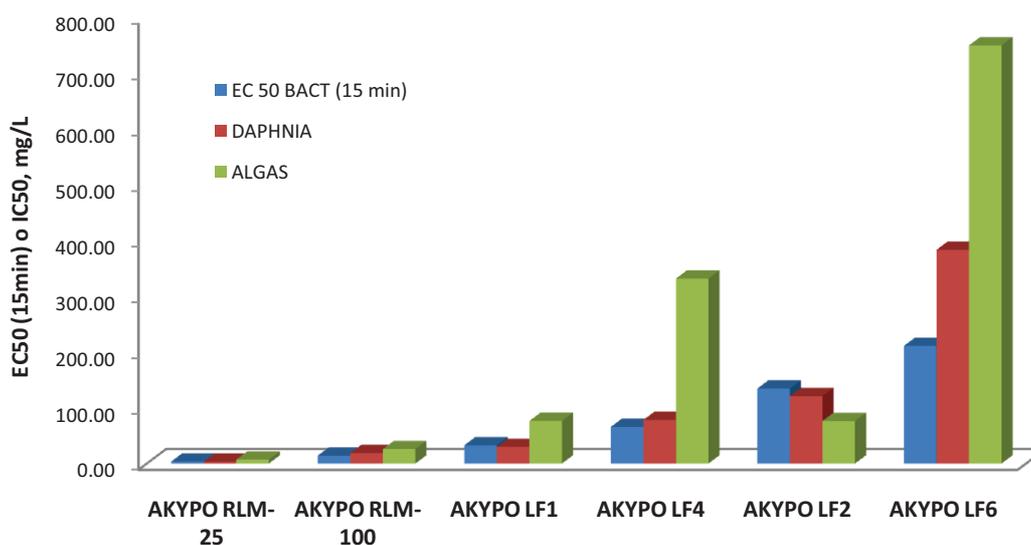


Figura V.29.-Resumen datos de toxicidad para ácidos alquil éter carboxílicos

De los resultados obtenidos se observa como para todos los métodos de ensayo la toxicidad es mayor para los tensioactivos de cadena alquílica más larga, como son los AKYPO RLM-25 y RLM-100, mientras que el de menor cadena, AKYPO LF6, es el de menor toxicidad. En cuanto al grado de etoxilación, comparando tensioactivos de igual longitud de cadena, los datos de toxicidad son mayores para los de menor grado de etoxilación. Si se analizan conjuntamente los datos de toxicidad con los resultados de biodegradación última para ácidos alquil éter carboxílicos obtenidos en este estudio mediante ensayo estático (apartado 5.1.1), se observa que la biodegradación es menor para aquellos de mayor longitud de cadena y menor grado de etoxilación. Por tanto en este caso no se cumple la premisa general de que los tensioactivos más tóxicos resultan ser los más biodegradables (Sánchez-Leal, 1995), siendo el AKYPO RLM-25 el menos biodegradable y a la vez el más tóxico.

Con respecto al método de ensayo, las bacterias *Vibrio fischeri* son las más sensibles a los efectos tóxicos de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, como ocurre para otro tensioactivo aniónico ampliamente conocido sodium dodecyl sulphate (Mariani, 2006), mientras que las microalgas *Selenastrum capricornutum* son las menos sensibles, excepto para el AKYPO LF2, para el que ocurre justo lo contrario.

El AKYPO LF4, es el único que presenta un comportamiento diferente al resto de los tensioactivos y no se ajusta del todo a las conclusiones anteriores. En todo caso las

comparaciones y análisis de los datos para éste y AKYPO LF6 resultan complicadas ya que están formados por mezclas de dos tensioactivos de diferente longitud y grado de etoxilación.

Cabe destacar que el AKYPO LF6 es el de menor toxicidad en todos los casos, presentando valores muy superiores al resto de tensioactivos, en especial en el caso de microalgas, donde alcanza un valor de 750.24 mg/L. Mientras que el AKYPO RLM-25 es el de mayor toxicidad, con un valor de 3.48 mg/L para *Daphnia magna*.

Un parámetro característico para los tensioactivos es la concentración micelar crítica (CMC), si se representa la variación de toxicidad frente a la CMC (Figura V.30) se encuentra que la toxicidad disminuye a medida que aumenta la CMC, lo que está de acuerdo con los resultados presentados por Cella (Cella, 1955), que demostraron que tensioactivos con valores bajos de CMC presentaban gran actividad germicida. En todos los casos los valores de toxicidad obtenidos están por debajo de la CMC, debido a que los efectos tóxicos generalmente están relacionados con los monómeros libres en lugar de con las micelas (Singer, 1995). Sin embargo, las concentraciones de tensioactivos en el medio están normalmente por debajo de la CMC, por tanto esta característica probablemente no es decisiva en la ecotoxicidad de tensioactivos (Ivankovic, 2010).

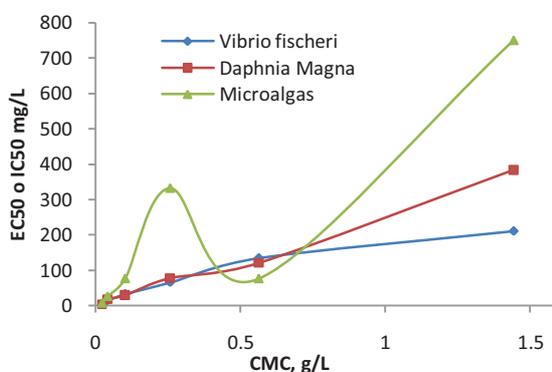


Figura V.30- Variación de la toxicidad con la CMC.

5.5.3 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS

Con motivo de poder estudiar los posibles efectos sinérgicos al utilizar mezclas de tensioactivos y como se ve afectada la toxicidad de dichas mezclas, se han ensayado mezclas de algunos de los ácidos alquil éter carboxílicos. Las mezclas utilizadas han sido: AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25, AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 y AKYPO RLM-25 + AKYPO RLM-100. Las mezclas utilizadas se preparan utilizando proporciones 1:1 partiendo de tensioactivos de la misma concentración, y se realizan ensayos con bacterias luminiscentes, *Daphnia magna* y Microalgas.

5.5.3.1 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

La Figura V.31 muestra las linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para las mezclas de tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos. Los puntos representan los resultados experimentales (valor medio de dos réplicas) y la línea el ajuste de la Ecuación V.9 a los datos.

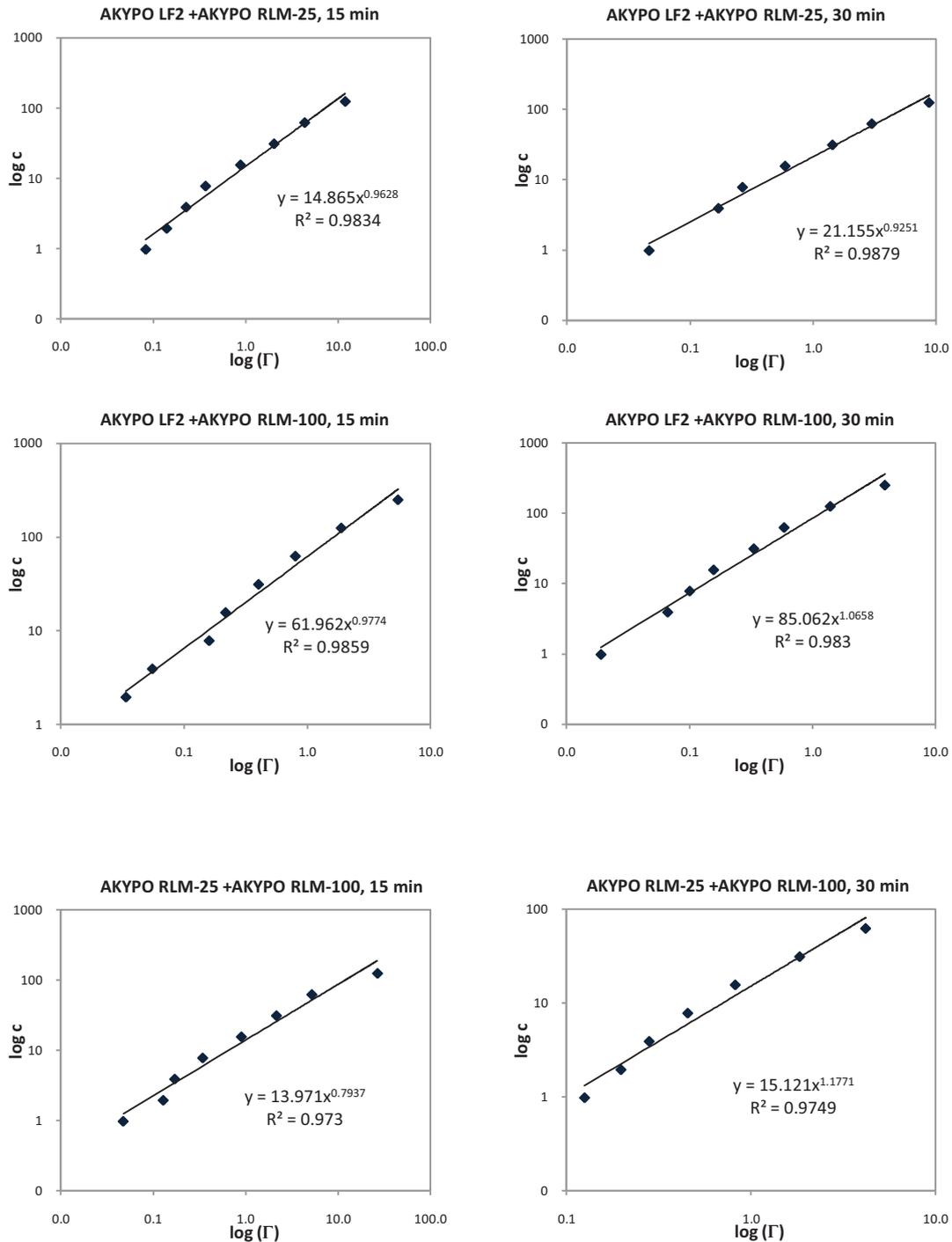


Figura V.31.-Linealización entre la función gamma y la concentración para mezclas de tensioactivos AKYPO

Los resultados de EC_{50} y EC_{20} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.18 y en la Figura V.32 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.18.-Datos de EC_{50} y EC_{20} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

TOXICIDAD AKYPOS (mg/L)				
TENSIOACTIVO	EC 20 BACT (15 min)	EC 50 BACT (15 min)	EC20 BACT (30 min)	EC 50 BACT (30 min)
LF2 + RLM 25	6.09	14.96	6.90	18.94
RLM-25 + RLM-100	6.33	17.04	6.61	19.07
LF2 + RLM 100	13.57	54.70	15.82	64.04

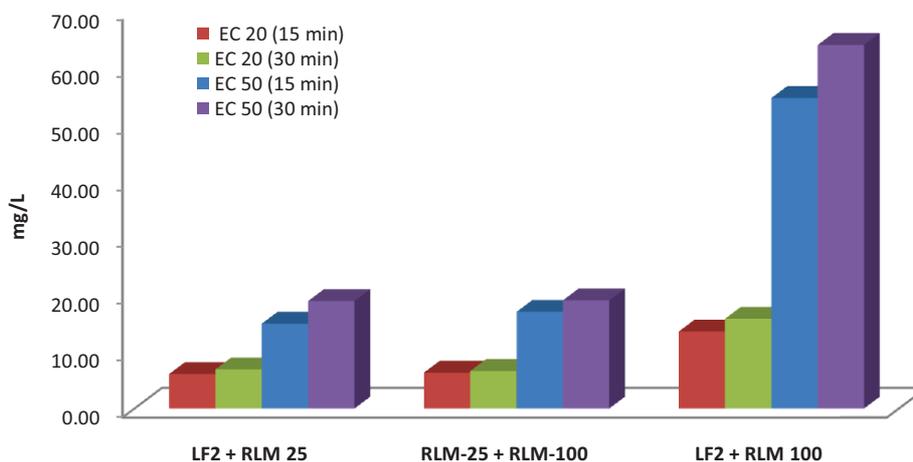


Figura V.32.-datos de EC_{50} y EC_{20} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

5.5.3.2 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍLICOS CON *DAPHNIA MAGNA*

En la Figura V.33 se muestran las linealizaciones del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo después de 24 horas de incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

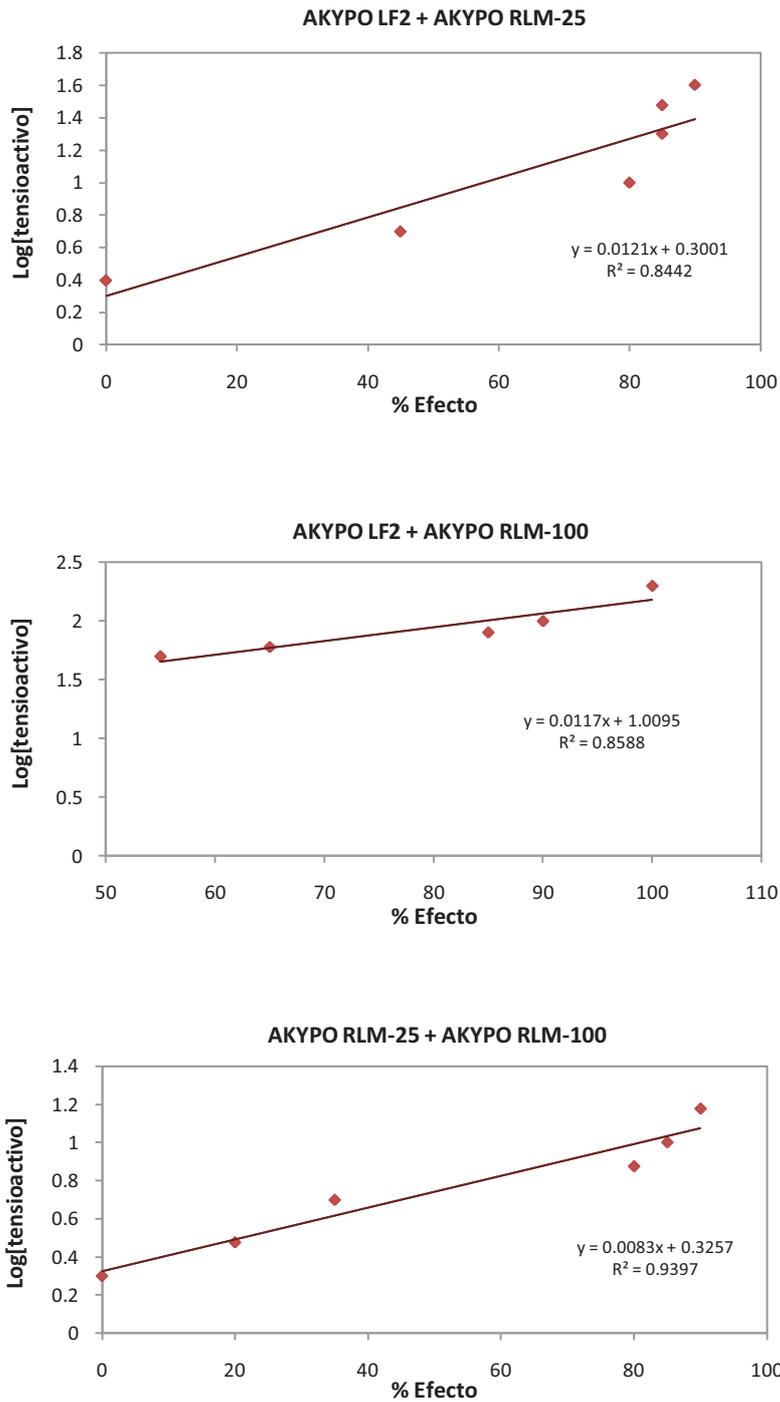
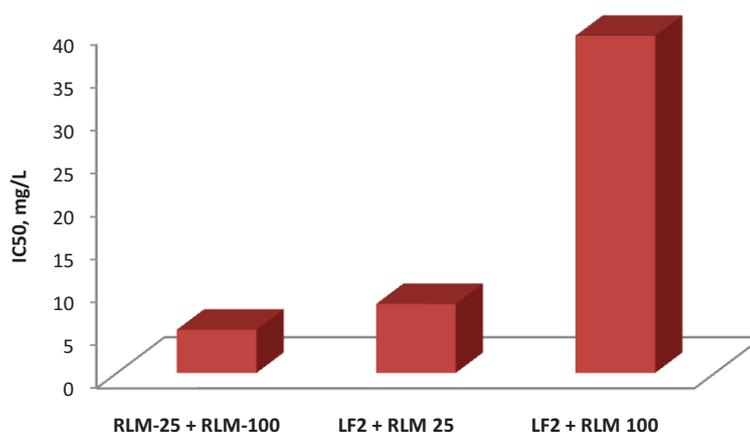


Figura V.33.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.19 y en la Figura V.34 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.19.-Datos de IC_{50} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con *Daphnia magna*

TOXICIDAD MEZCLAS AKYPOS	
TENSIOACTIVO	IC_{50} , mg/L
RLM-25 + RLM-100	5.04
LF2 + RLM 25	8.04
LF2 + RLM 100	39.31

Figura V.34.-Datos de IC_{50} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con *Daphnia magna*

5.5.3.3 TOXICIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDOS ALQUIL ÉTER CARBOXÍlicos CON MICROALGAS

En la Figura V.35 se muestran las linealizaciones del % de inhibición del crecimiento y la concentración de tensioactivo después de 72 horas de incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.11 a los datos.

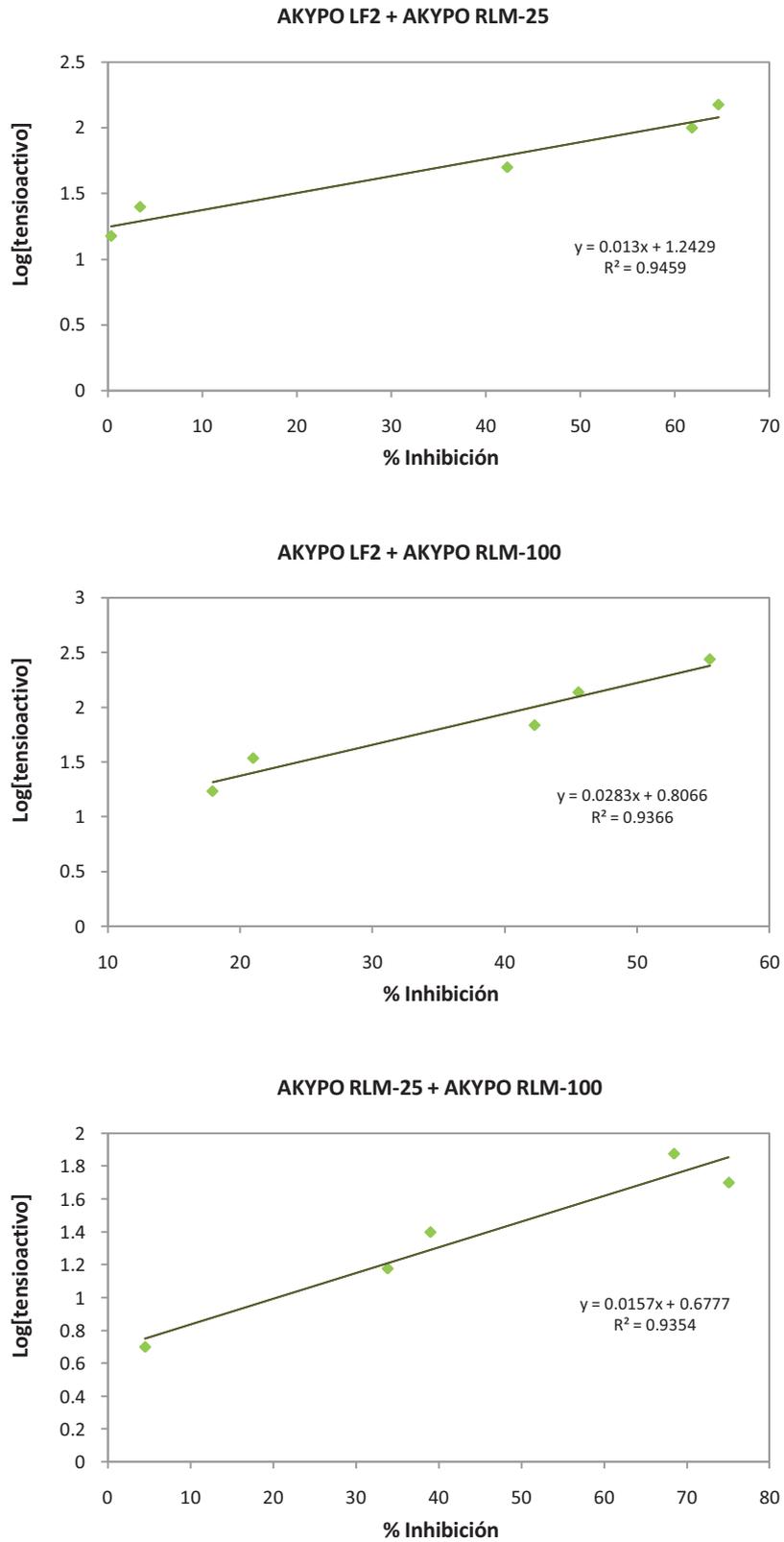


Figura V.35.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

Los resultados de EC_{50} obtenidos a partir de las gráficas anteriores y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.20 y en la Figura V.36 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.20.-Datos de IC_{50} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas

TOXICIDAD MEZCLAS AKYPOS	
TENSIOACTIVO	EC_{50} , mg/L
RLM-25 + RLM-100	29.02
LF2 + RLM 25	78.14
LF2 + RLM 100	166.57

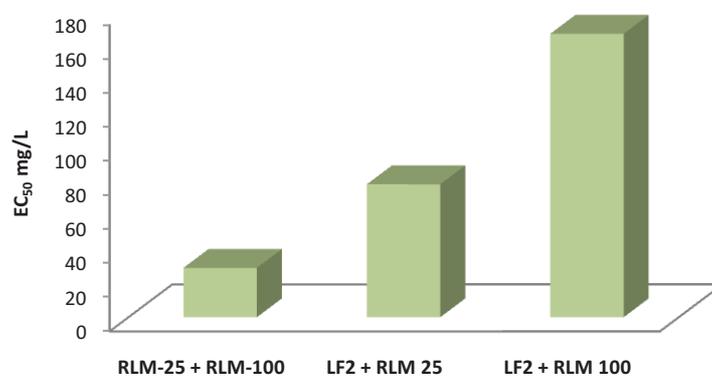


Figura V.36.-Datos de EC_{50} para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas

A continuación en la Tabla V.21, y en la figura V.37 se muestran a modo de resumen todos los datos de toxicidad obtenidos para las mezclas de ácidos alquítercarboxílicos con los tres métodos de ensayo en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.21.-Resumen datos de toxicidad para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos

TENSIOACTIVO	EC_{50} o IC_{50} mg/L		
	EC_{50} BACT (15 min)	DAPHNIA	ALGAS
LF2 + RLM 25	14.96	8.04	78.14
RLM-25 + RLM-100	17.04	5.04	29.02
LF2 + RLM 100	54.70	39.31	166.57

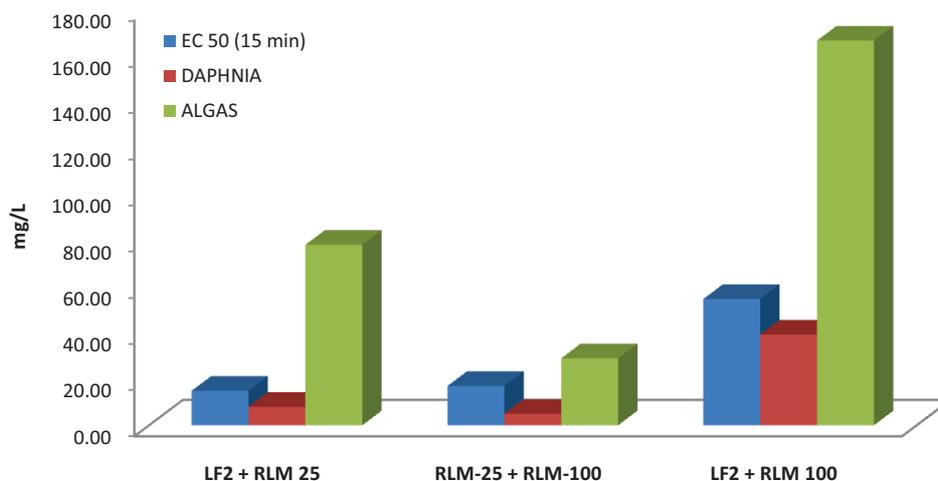


Figura V.37.-Resumen datos de toxicidad para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos

El organismo más sensible a los efectos tóxicos de las mezclas de ácido alquil éter carboxílicos es la *Daphnia magna*, por el contrario el menos sensible son las Microalgas.

De las mezclas estudiadas resulta especialmente poco tóxica la formada por LF2 y RLM-100, para la que se obtienen los mejores datos de toxicidad, ya que son la mezcla de los dos tensioactivos de menor longitud de cadena.

5.5.4 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS

Para los alquilpoliglucósidos se han realizado ensayos de toxicidad con bacterias luminiscentes *Daphnia magna* y Microalgas. Los tensioactivos utilizados en este estudio han sido GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 Y GLUCOPON 650.

Las principales propiedades se muestran en la tabla V.22, donde donde se indican la longitud de la cadena alquílica (R), el grado de polimerización (DP), el peso molecular medio PM_{medio} , la concentración micelar crítica (CMC), el balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y el % de humedad.

Tabla V.22: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados

NOMBRE COMERCIAL	R	DP	PM_{medio}	CMC, mg/L	HLB	%Humedad
GLUCOPON® 215	C8-C10	1.42	390	1012	12.6	37.0
GLUCOPON® 600	C12-C14	1.59	386	50	12.7	46.6
GLUCOPON® 650	C8-C14	1.35	397	153	12.8	50.4

5.5.4.1 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

La Figura V.38 muestra las linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para las mezclas de tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos. Los puntos representan los resultados experimentales (valor medio de dos réplicas) y la línea el ajuste de la Ecuación V.9 a los datos.

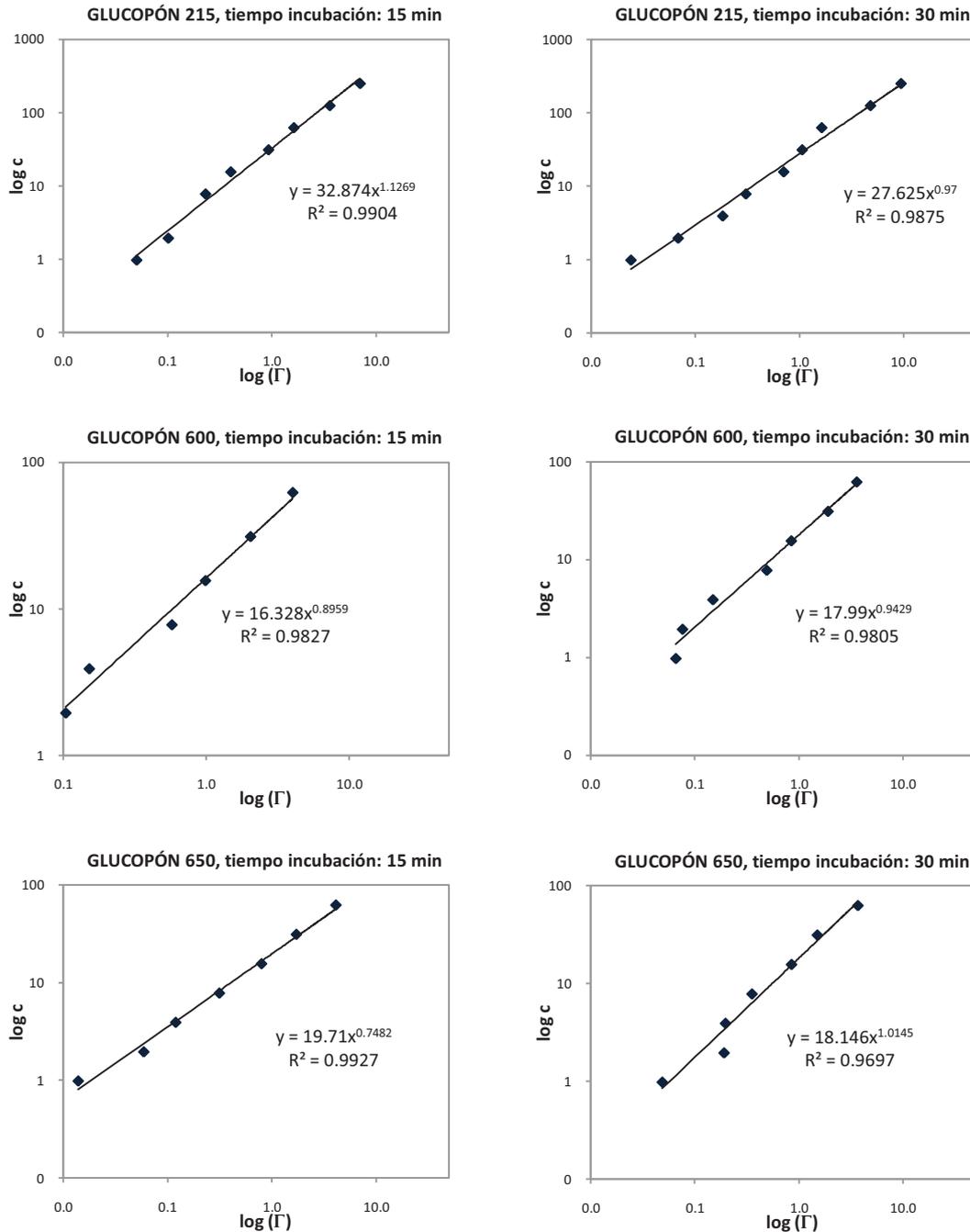


Figura V.38.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos GLUCOPON

Los resultados de EC_{50} y EC_{20} obtenidos a partir de las gráficas anteriores y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.23 y en la Figura V.39 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.23.-Datos de EC_{50} y EC_{20} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

TOXICIDAD GLUCOPON (mg/L)				
TENSIOACTIVO	EC 20 BACT (15 min)	EC 50 BACT (15 min)	EC20 BACT (30 min)	EC 50 BACT (30 min)
GLUCOPON 600	4.2595	15.9995	4.471	17.4405
GLUCOPON 650	6.3425	12.295	4.9325	19.046
GLUCOPON 215	8.338	35.544	7.743	31.231

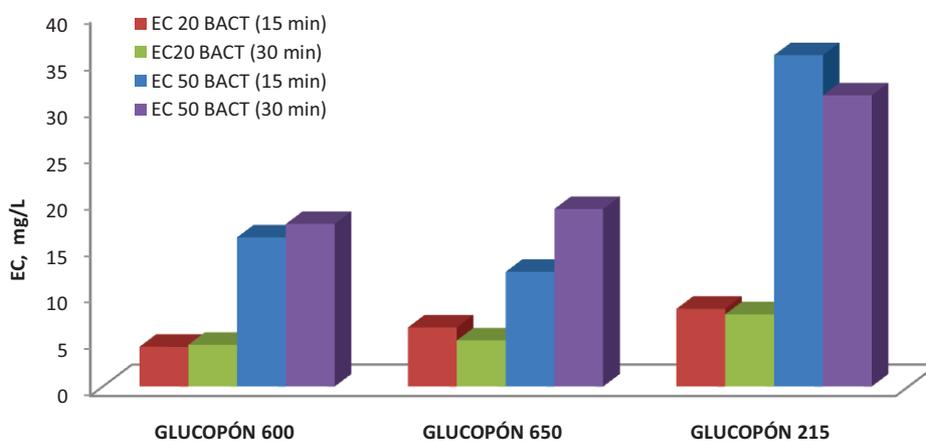


Figura V.39.-Datos de EC_{50} y EC_{20} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con bacterias luminiscentes

5.5.4.2 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON *DAPHNIA MAGNA*

En la Figura V.40 se muestran las linealizaciones del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo después de 24 horas en incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

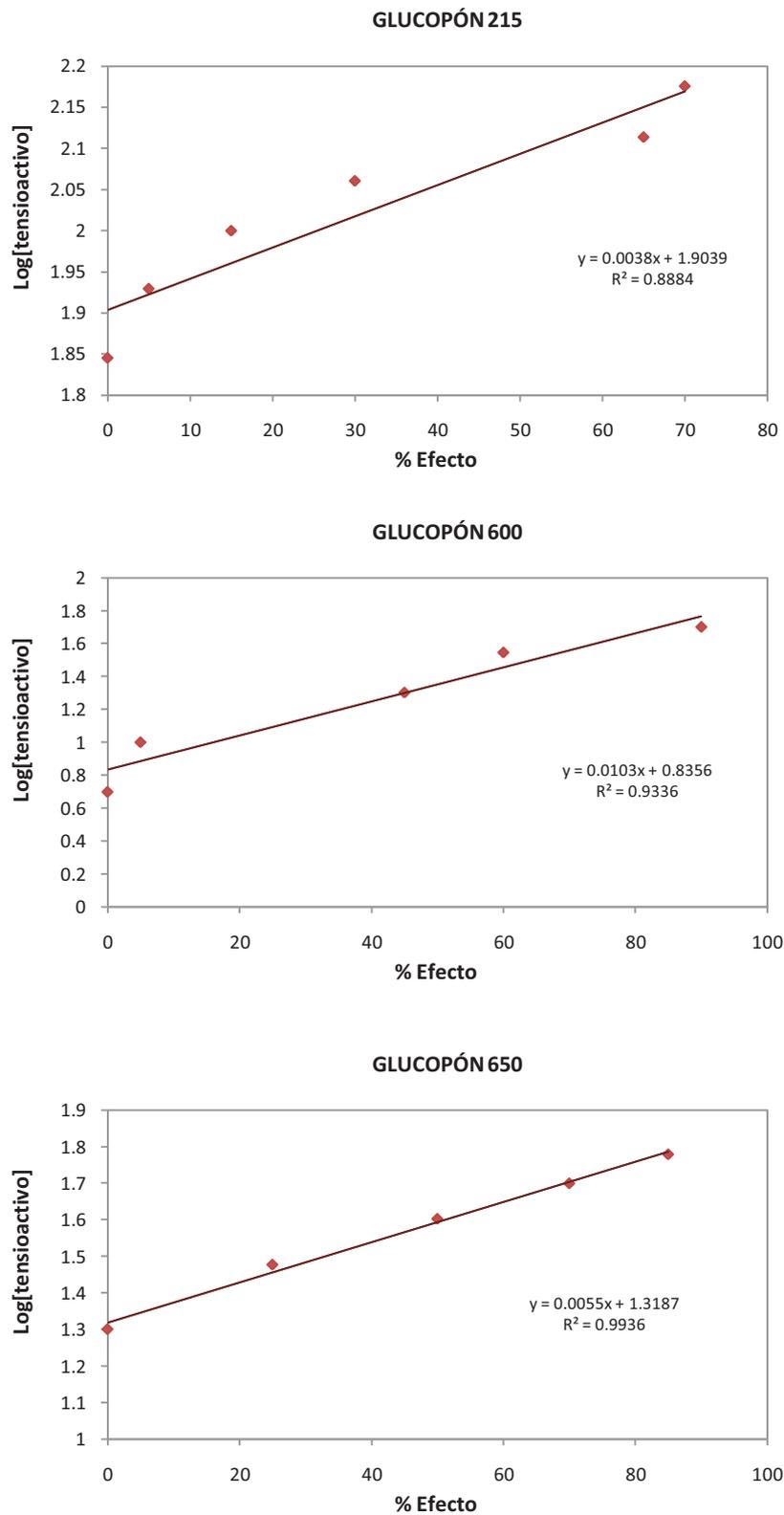


Figura V.40.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.24 y en la Figura V.41 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.24.-Datos de IC_{50} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con *Daphnia magna*

TOXICIDAD GLUCOPON	
TENSIOACTIVO	IC_{50} , mg/L
GLUCOPON 600	22.42
GLUCOPON 650	39.24
GLUCOPON 215	124.14

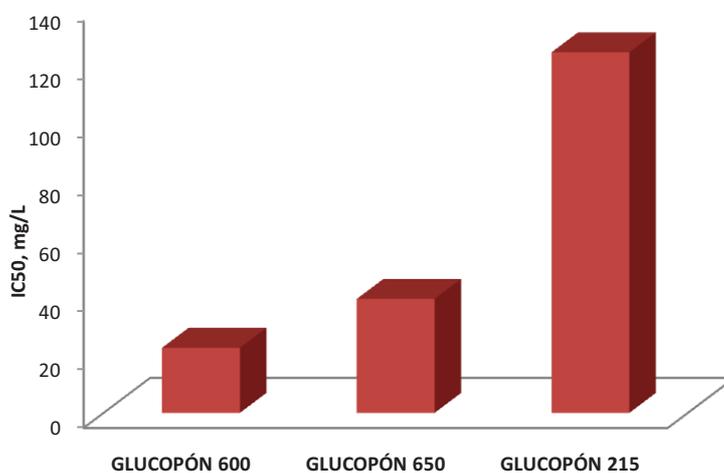


Figura V.41.-Datos de IC_{50} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con *Daphnia magna*

5.5.4.3 TOXICIDAD DE ALQUILPOLIGLUCÓSIDOS CON MICROALGAS

En la Figura V.42 se muestran las linealizaciones del % de inhibición del crecimiento y la concentración de tensioactivo después de 72 horas en incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.11 a los datos.

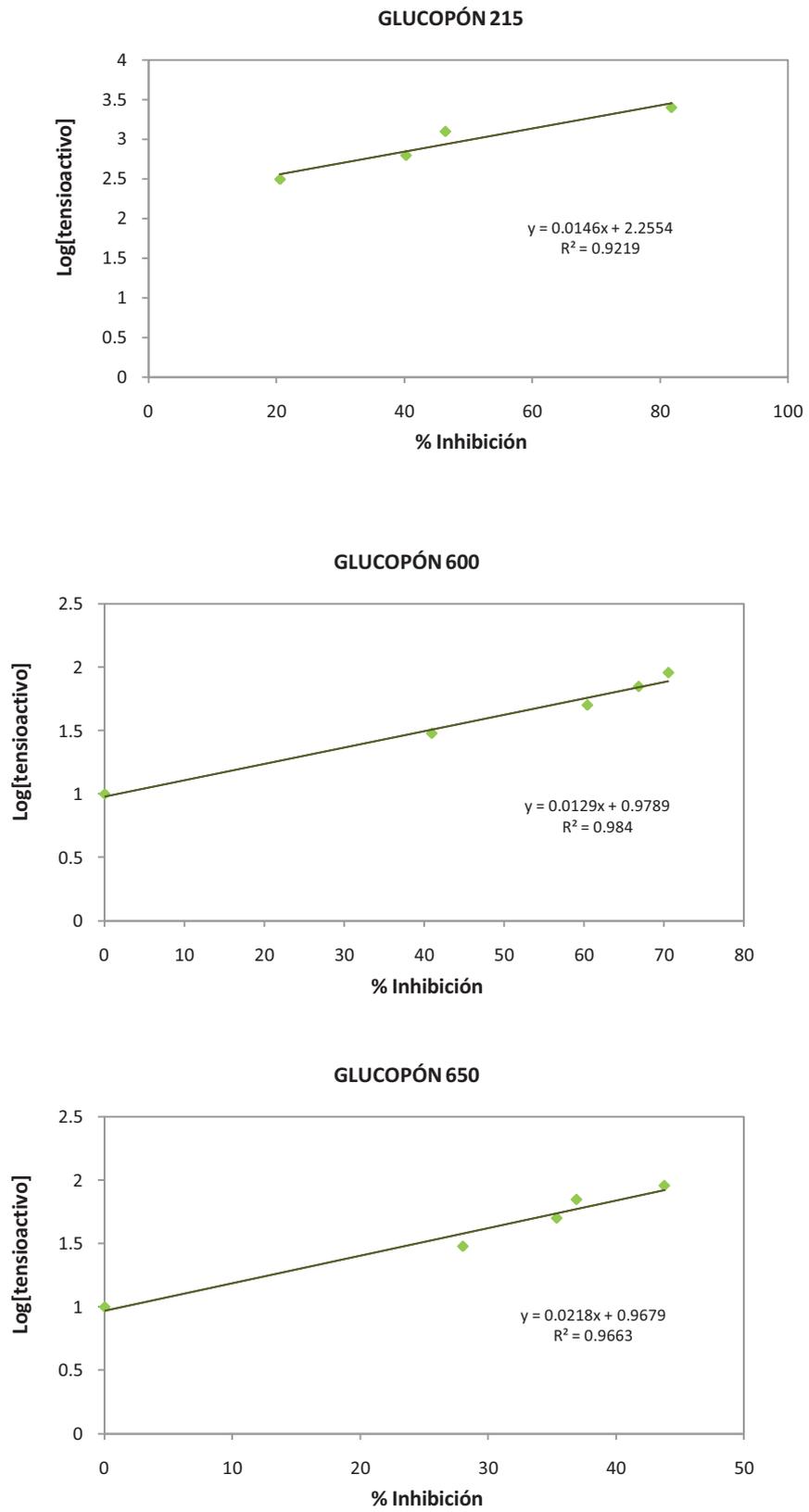


Figura V.42.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

Los resultados de EC_{50} obtenidos a partir de las gráficas anteriores y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.25 y en la Figura V.43 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.25.-Datos de IC_{50} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con microalgas

TOXICIDAD GLUCOPON	
TENSIOACTIVO	EC_{50} , mg/L
GLUCOPON 600	46.005
GLUCOPON 650	80.505
GLUCOPON 215	1112.93

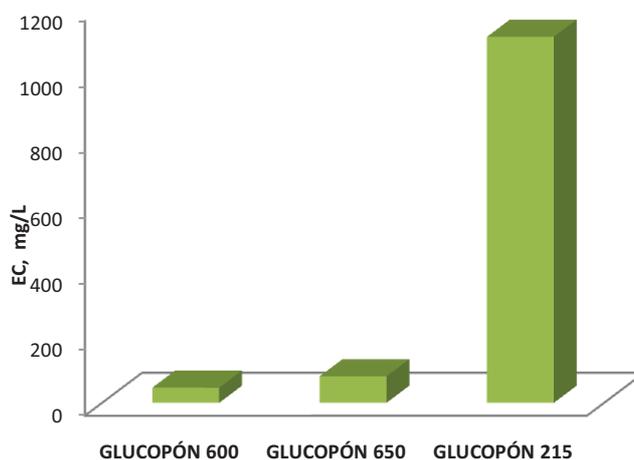


Figura V.43.-Datos de EC_{50} para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con microalgas

A continuación en la Tabla V.26, y en la figura V.44 se muestran a modo de resumen todos los datos de toxicidad obtenidos para los alquilpoliglucósidos mediante los tres métodos de ensayo en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.26.-Resumen datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos

TENSIOACTIVO	EC_{50} o IC_{50} mg/L		
	EC_{50} BACT (15 min)	DAPHNIA	ALGAS
GLUCOPON 650	12.295	39.24	80.50
GLUCOPON 600	15.9995	22.42	46.01
GLUCOPON 215	35.544	124.14	1112.93

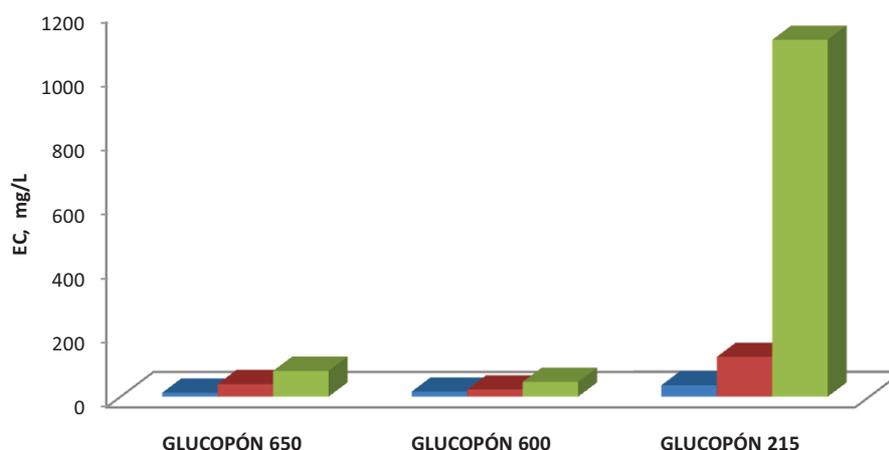


Figura V.44.-Resumen datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos

Los datos obtenidos muestran que las bacterias *Vibrio Fischeri* son más sensibles a los efectos tóxicos de los alquilpoliglucósidos mientras que las microalgas son las que presentan menor sensibilidad en todos los casos.

Los resultados permiten predecir que el más tóxico de los alquilpoliglucósidos estudiados es el GLUCOPON 600, que es el de mayor longitud de cadena alquílica, y el menos tóxico el GLUCOPON 215 de menor longitud.

Jurado y col., (Jurado, 2009), encontraron datos de EC_{50} para bacterias *Vibrio Fischeri* entre 14 y 29 mg/L, de modo que el menos tóxico fue el GLUCOPON 215, de menor longitud de cadena, lo que está de acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio.

García (1997), utilizó *Daphnia magna* para determinar la toxicidad aguda de alquilpoliglucósidos de longitud de cadena C_9 - C_{16} , encontrando que las mezclas de los más hidrofóbicos, es decir los de mayor longitud de cadena, fueron los más tóxicos para el test ensayado. Los resultados coinciden también con los ensayos realizados en el presente estudio. (Figura V.44). Estudios similares mostraron que homólogos de los alquilpoliglucósidos con las cadenas alquílicas más largas presentan los valores más altos de toxicidad (Uppgard, 2000).

Si se analizan conjuntamente los datos de toxicidad con los datos de biodegradabilidad obtenidos en el apartado 5.2.1, se observa que la biodegradabilidad es mayor para el tensioactivo de menor longitud, GLUCOPON 215, mientras que para el de cadena más larga, GLUCOPON 600, se obtienen la peor biodegradabilidad. De modo que, en este caso al igual que para ácidos alquil éter carboxílicos, no se cumple que el tensioactivo más tóxico resulta ser

más fácilmente biodegradable (Sánchez-Leal, 1995), ya que el GLUCOPON 600 es el más tóxico y a la vez el menos biodegradable.

Un parámetro característico para los tensioactivos es la concentración micelar crítica (CMC), al representar la variación de toxicidad frente a la CMC (Figura V.45) se encuentra una relación potencial entre toxicidad y CMC, la toxicidad disminuye al aumentar la CMC, lo que está de acuerdo con los resultados presentados por Cella (Cella, 1955) y Jurado (Jurado, 2009), que demostraron que tensioactivos con valores bajos de CMC presentaban gran actividad germicida. En todos los casos los valores de toxicidad obtenidos están por debajo de la CMC, debido a que los efectos tóxicos generalmente están relacionados con los monómeros libres en lugar de con las micelas (Singer, 1995). Sin embargo, las concentraciones de tensioactivos en el medio están normalmente por debajo de la CMC, por tanto esta característica probablemente no es decisiva en la ecotoxicidad de tensioactivos (Ivankovic, 2010).

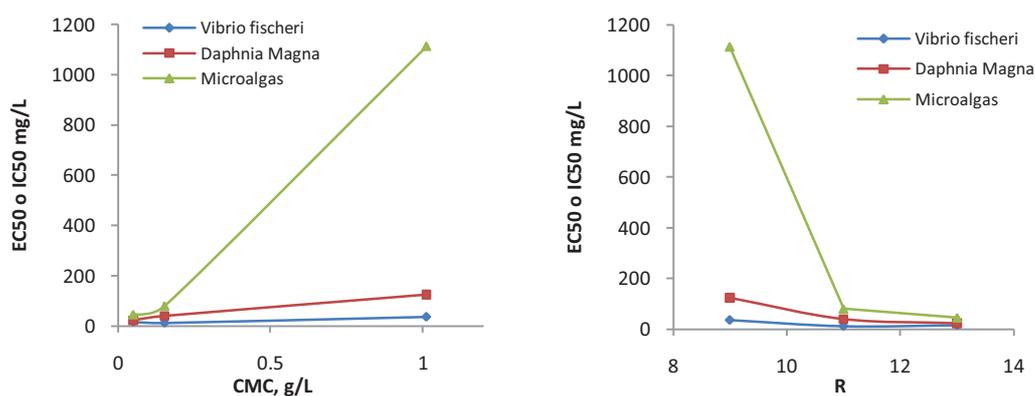


Figura V.45.- Variación de la toxicidad con la CMC y longitud de la cadena alquílica (R)

Entre los grupos de tensioactivos con la misma longitud de cadena alquílica, los alquilpoliglucósidos tienen una toxicidad acuática favorable para peces, bacterias, algas, etc. (Willing, 2004). Los test de toxicidad para diferentes tipos de alquilpoliglucósidos muestran menor toxicidad comparado con otros tensioactivos tales como nonifenol etoxilado (NPEO) y alquilbenceno sulfonato lineal (LAS) (Li and Schröder, 2000), alcoholes etoxilados (Morrall, 2003) y otros tensioactivos no iónicos (Karpinska-Smulkowska and Moskal, 2004).

5.5.5 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA

Para los óxidos de amina se han realizado ensayos de toxicidad con bacterias luminiscentes y *Daphnia magna* para los OXIDET DM-4, OXIDET DM-20 y OXIDET L75C, y con algas únicamente para OXIDET DM-4, OXIDET DM-20, ya que para OXIDET L75C se presentan

problemas de turbidez, lo que impide medir de forma correcta el crecimiento de algas en el espectrofotómetro.

Las principales propiedades se muestran en la tabla V.27, donde se indican la longitud de la cadena (R), el tanto por ciento de materia activa y la concentración micelar crítica (CMC).

Tabla V.27: Propiedades óxidos de amina utilizados

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	Nº CAS	R	% Materia Activa	CMC, mg/L
OXIDET DM-4®	Myristamine Oxide	3332-27-2	C14	≈ 30	115.7
OXIDET DM-20®	Lauramine Oxide	1643-20-5	C12	≈ 30	158.1
OXIDET L75C®	Cocamidopropylamine Oxide	68155-09-9	R'CONH(CH ₂) ₃ R' = C12	≈ 33	199.5

5.5.5.1 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON BACTERIAS LUMINISCENTES

La Figura V.46 muestra las linealizaciones de la concentración y la función Gamma obtenidas para los tensioactivos ensayados para tiempos de incubación de 15 y 30 minutos. Los puntos representan los resultados experimentales (valor medio de dos réplicas) y la línea el ajuste de la Ecuación V.9 a los datos.

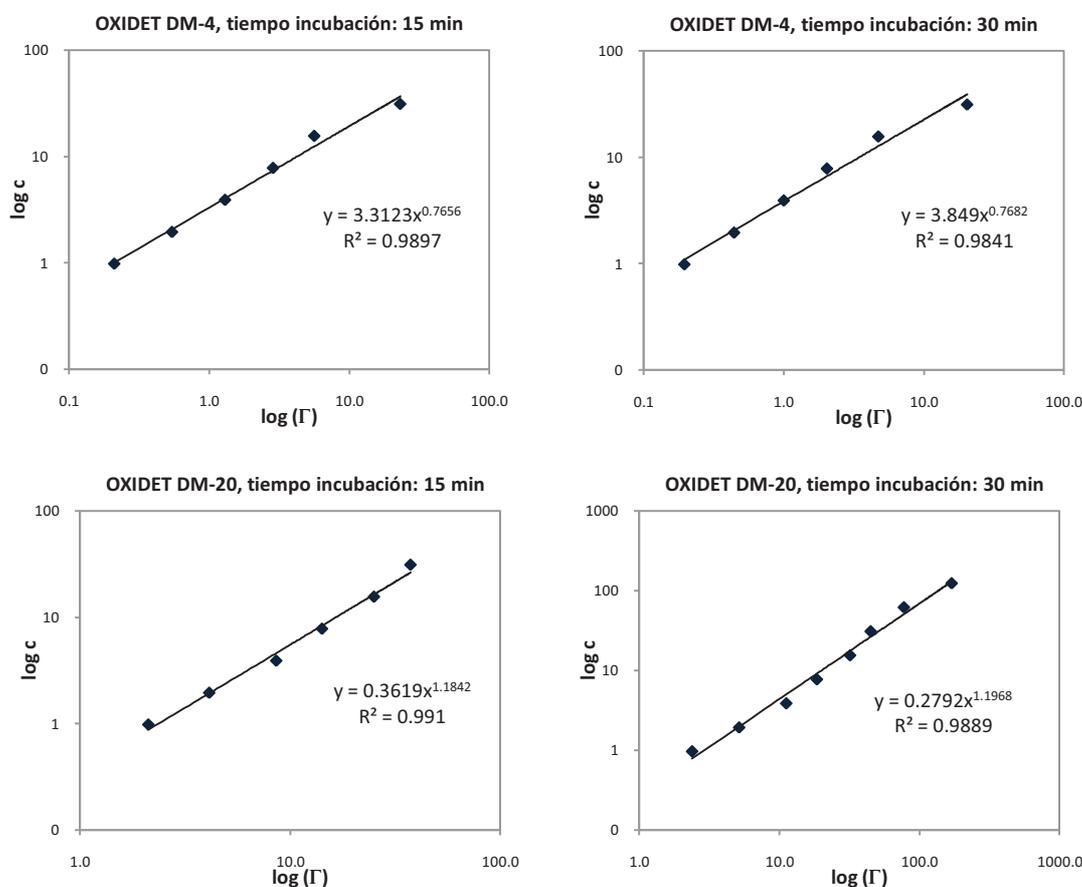


Figura V.46.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos OXIDET

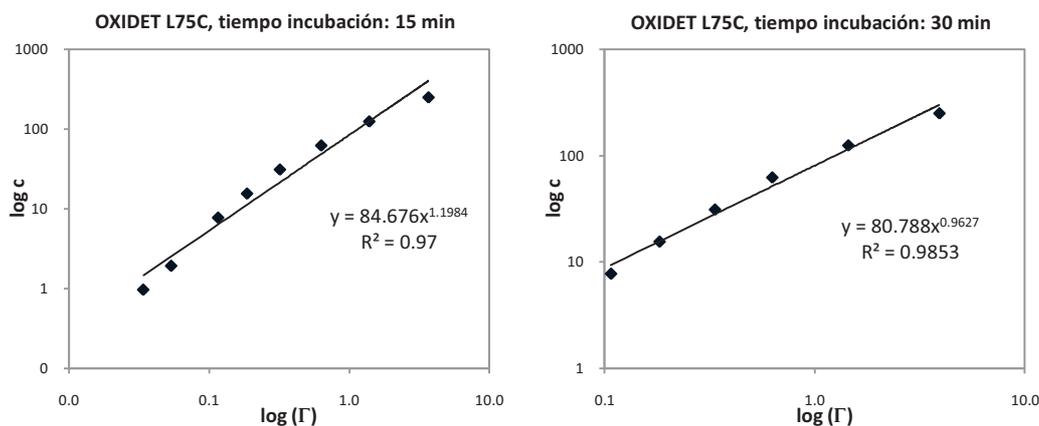


Figura V.46 (Continuación).-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos OXIDET

Los resultados de EC₅₀ y EC₂₀ obtenidos a partir de las gráficas anteriores y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.28 y en la Figura V.47 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.28.-Datos de EC₅₀ y EC₂₀ para óxidos de amina mediante ensayo con bacterias luminiscentes

TOXICIDAD ÓXIDOS DE AMINA (mg/L)				
TENSIOACTIVO	EC 20 BACT (15 min)	EC 50 BACT (15 min)	EC20 BACT (30 min)	EC 50 BACT (30 min)
OXIDET DM-20	0.068	0.3544	0.0599	0.2985
OXIDET DM-4	1.1775	3.3906	1.3495	3.8495
OXIDET L75C	15.4855	85.867	21.367	82.751

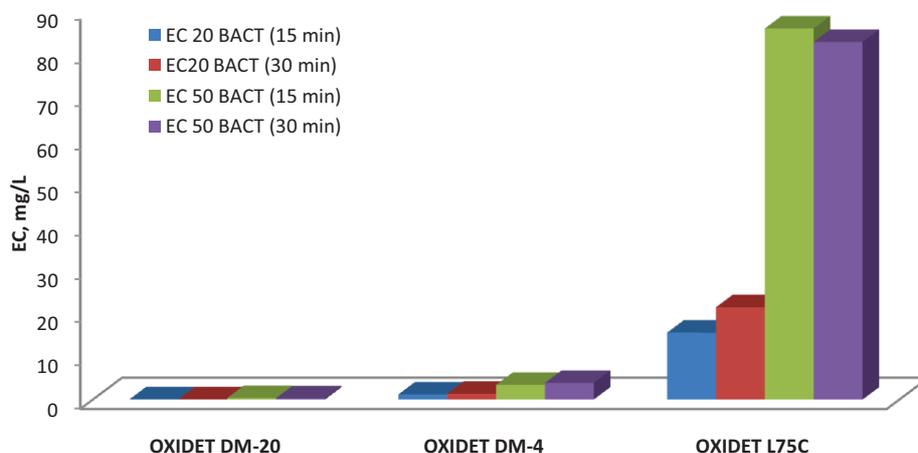


Figura V.47.-datos de EC₅₀ y EC₂₀ para óxidos de amina mediante ensayo con bacterias luminiscentes

5.5.5.2 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON *DAPHNIA MAGNA*

En la Figura V.48 se muestran las linealizaciones del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo después de 24 horas en incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

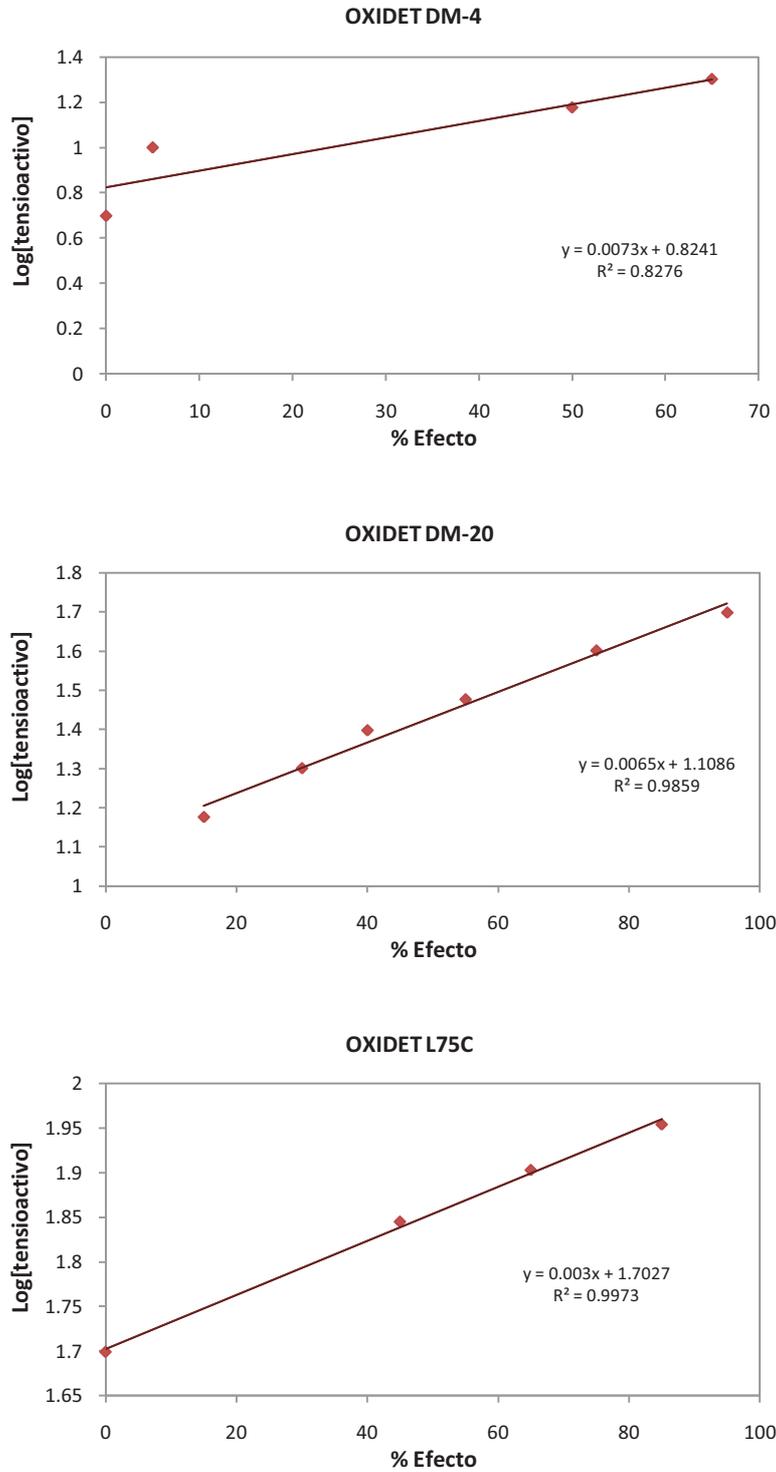


Figura V.48.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.29 y en la Figura V.49 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.29.-Datos de IC_{50} para óxidos de amina mediante ensayo con *Daphnia magna*

TOXICIDAD ÓXIDOS DE AMINA	
TENSIOACTIVO	IC_{50} , mg/L
OXIDET DM-4	15.46
OXIDET DM-20	27.14
OXIDET L75C	71.24

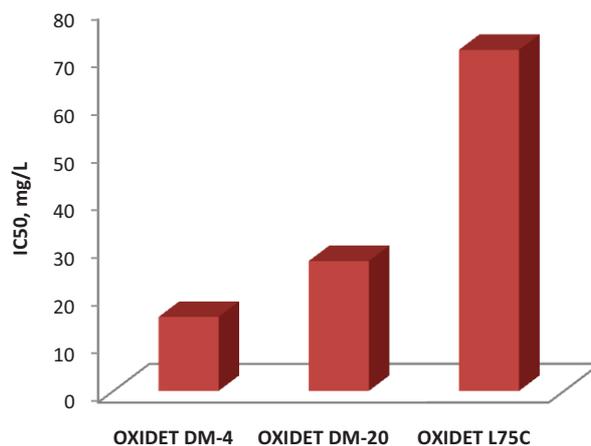


Figura V.49.-Datos de IC_{50} para óxidos de amina mediante ensayo con *Daphnia magna*

5.5.5.3 TOXICIDAD DE ÓXIDOS DE AMINA CON MICROALGAS

En la Figura V.50 se muestran las linealizaciones del % de inhibición del crecimiento y la concentración de tensioactivo después de 72 horas en incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.11 a los datos.

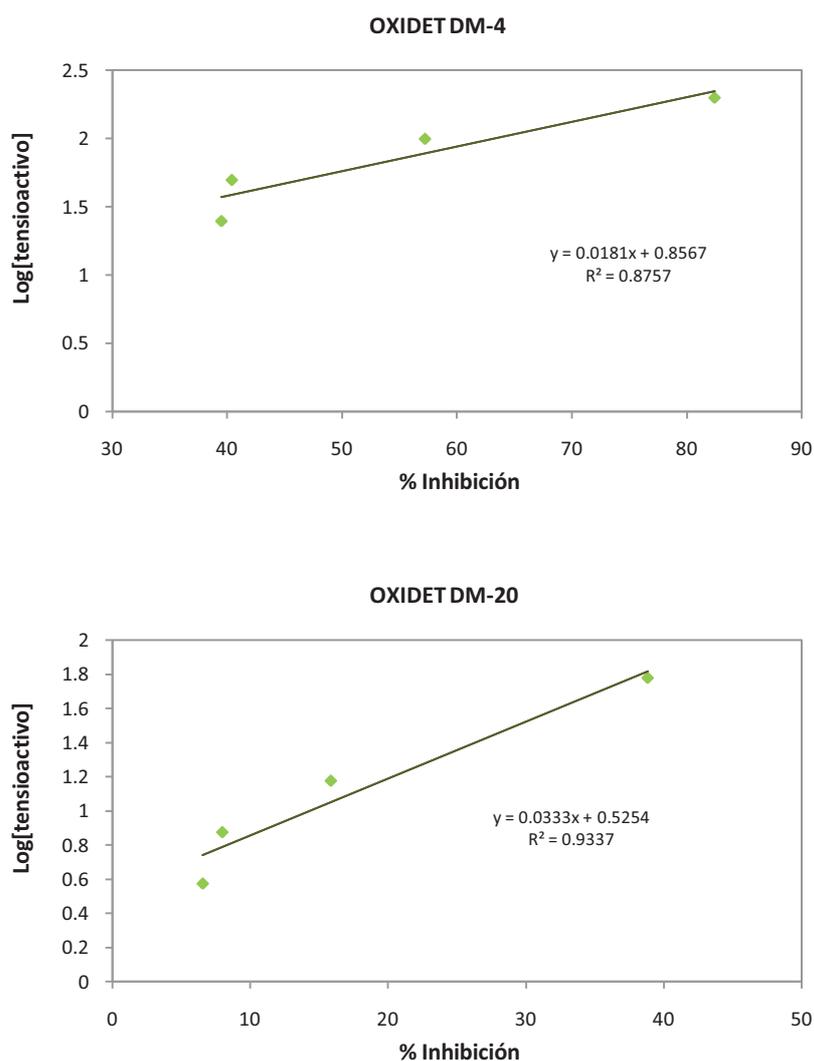


Figura V.50.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

Los resultados de EC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.30 y en la Figura V.51 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.30.-Datos de IC_{50} para mezclas de óxidos de amina mediante ensayo con microalgas

TOXICIDAD ÓXIDOS DE AMINA	
TENSIOACTIVO	EC_{50} , mg/L
OXIDET DM-4	57.77
OXIDET DM-20	155.02

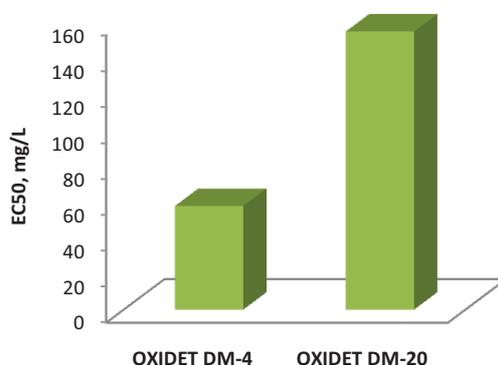


Figura V.51.-Datos de EC₅₀ para óxidos de amina mediante ensayo con microalgas

A continuación en la Tabla V.31, y en la figura V.52 se muestran a modo de resumen todos los datos de toxicidad obtenidos para los alquilpoliglucósidos mediante los tres métodos de ensayo en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.31.-Resumen datos de toxicidad para óxidos de amina

TENSIOLACTIVO	EC ₅₀ o IC ₅₀ mg/L		
	EC ₅₀ BACT (15 min)	DAPHNIA	ALGAS
OXIDET DM-20	0.3544	27.14	155.02
OXIDET DM-4	3.3906	15.46	57.77
OXIDET L75C	85.867	71.24	--

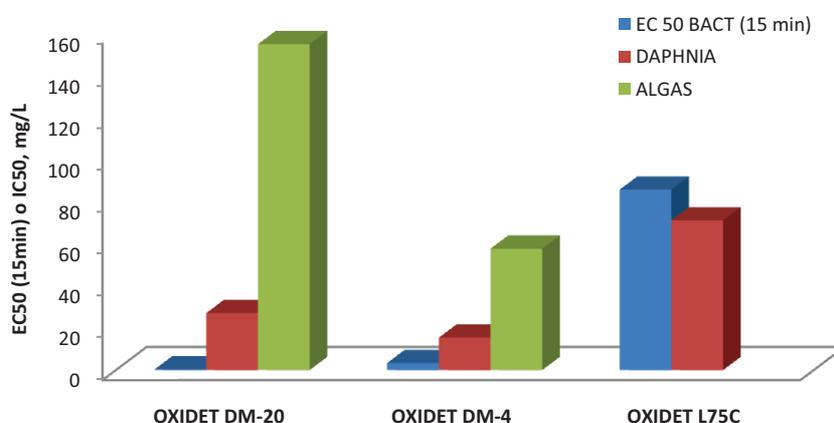


Figura V.52.-Resumen datos de toxicidad para óxidos de amina

Según los resultados obtenidos, de nuevo los organismos más sensibles a los efectos tóxicos de los óxidos de amina son las bacterias luminiscentes *Vibrio Fischeri*, mientras que las microalgas *Selenastrum capricornutum*, son las de menor sensibilidad.

Otro aspecto importante a destacar es que se cumple que los tensioactivos de mayor longitud de cadena son los que presentan mayor toxicidad, como ocurre para OXIDET DM-4 de longitud C_{14} y OXIDET DM-20 de C_{12} , lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por García para óxidos de amina con *Daphnia magna* (García, 2007).

En cuanto al tensioactivo OXIDET L75C, presenta una estructura diferente a los de la serie DM incluyendo un grupo amino en la cadena alquílica grasa, dichos cambios en la estructura hacen que presente una menor toxicidad respecto a los otros óxidos de amina estudiados, lo que probablemente es resultado del incremento del carácter hidrofílico del tensioactivo (García, 2007).

Teniendo en cuenta la concentración micelar crítica (CMC), si se representa la variación de toxicidad frente a la CMC (Figura V.53) se encuentra que la toxicidad disminuye a medida que aumenta la CMC, lo que está de acuerdo con los resultados presentados por Cella (Cella, 1955) que demostraron que tensioactivos con valores bajos de CMC presentaban gran actividad germicida. En todos los casos los valores de toxicidad obtenidos están por debajo de la CMC, debido a que los efectos tóxicos generalmente están relacionados con los monómeros libres en lugar de con las micelas (Singer, 1995). Sin embargo, las concentraciones de tensioactivos en el medio están normalmente por debajo de la CMC, por tanto esta característica probablemente no es decisiva en la ecotoxicidad de tensioactivos (Ivankovic, 2010).

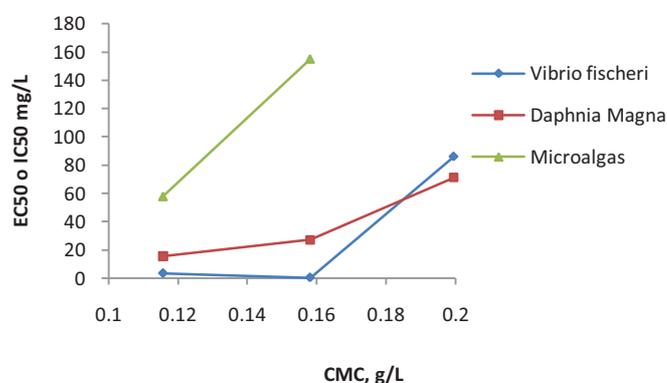


Figura V.53.- Variación de la toxicidad con la CMC

5.5.6 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS

Para este tipo de tensioactivos se ha realizado en ensayo con *Daphnia magna* para LEVENOL C-201 y LEVENOL C-421. Las principales propiedades se muestran en la tabla V.32, donde se indican el tanto por ciento de materia activa y la concentración micelar crítica (CMC).

Tabla V.32: Propiedades de los ésteres de glicerina polietoxilados utilizados

NOMBRE COMERCIAL	Descripción Química	Nº CAS	% Materia Activa	CMC, mg/L ⁽¹⁾
LEVENOL C-201®	Glycereth-17 Cocoate	68201-46-7	≈100	22.7
LEVENOL C-421®	Glycereth-2 Cocoate	68201-46-7	100	12.2

5.5.6.1 TOXICIDAD DE ÉSTERES DE GLICERINA POLIETOXILADOS CON *DAPHNIA MAGNA*

En la Figura V.54 se muestran las linealizaciones del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo después de 24 horas en incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

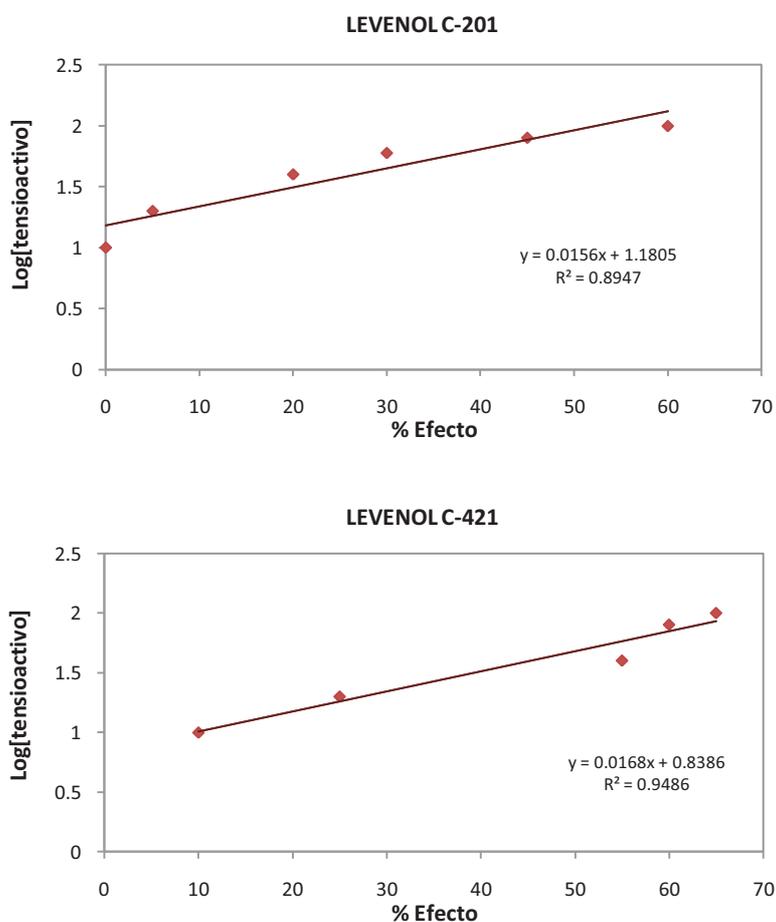


Figura V.54.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

Los resultados de IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.33 y en la Figura V.55 en orden decreciente de toxicidad.

Tabla V.33.-Datos de IC_{50} para ésteres de glicerina polietoxilados mediante ensayo con *Daphnia magna*

TOXICIDAD LEVENOL	
TENSIOACTIVO	IC_{50} , mg/L
LEVENOL C-421	47.70
LEVENOL C-201	91.31

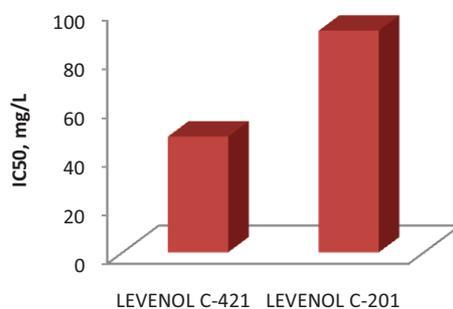


Figura V.55.-Datos de IC_{50} para ésteres de glicerina polietoxilados mediante ensayo con *Daphnia magna*

Para este grupo de tensioactivos se cumple que el tensioactivo de mayor longitud de cadenas, LEVENOL C-201, presenta mayor toxicidad. Teniendo en cuenta la concentración micelar crítica se observa como el de menor CMC, es también el más tóxico. Para estos tensioactivos los valores de toxicidad encontrados están por encima de los valores de CMC, al contrario que ocurre para el resto de tensioactivos ensayados.

5.5.7 TOXICIDAD DE ALQUILBENCENO SULFONATO LINEAL

Se han determinado los datos de toxicidad con *Daphnia magna* y microalga para el LAS, con objeto de comparar con éste los resultados obtenidos para los demás tensioactivos.

En la Figura V.56 se muestra la linealización del % de organismos inmovilizados y la concentración de tensioactivo después de 24 horas de contacto de los organismos con el tóxico. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.10 a los datos.

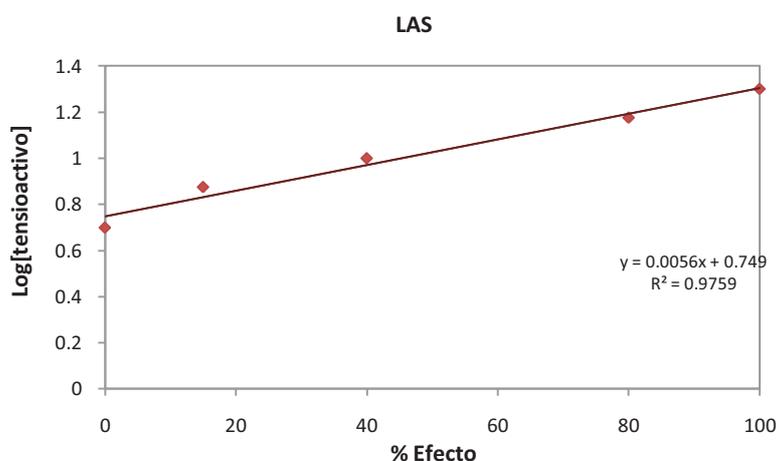


Figura V.56.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo

En la Figura V.57 se muestran la linealización del % de inhibición del crecimiento y la concentración de tensioactivo obtenidas después de 72 horas de incubación. Los puntos representan los resultados experimentales y la línea el ajuste de la Ecuación V.11 a los datos.

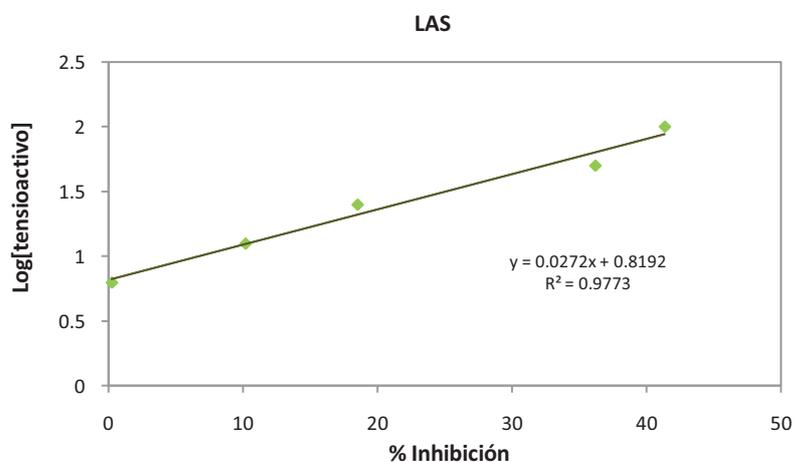


Figura V.57.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo

Los resultados de EC_{50} e IC_{50} obtenidos a partir de las anteriores gráficas y sus correspondientes linealizaciones se presentan en la Tabla V.34 y en la Figura V.58. Donde se incluyen además los datos de toxicidad mediante ensayo Luminstox obtenidos por Lechuga (Lechuga, 2005), para poder comparar la toxicidad con distintos ensayos.

Tabla V.34.-Datos de EC_{50} e IC_{50} para LAS

TOXICIDAD LAS, mg/L	
EC 20 BACT (15 min)	9.41
EC 50 BACT (15 min)	27.58
EC20 BACT (30 min)	8.29
EC 50 BACT (30 min)	26.5
IC 50 DAPHNIA	10.09
EC 50 ALGAS	151.07

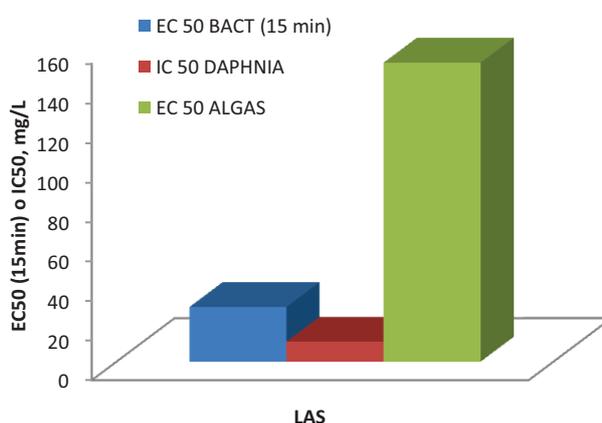


Figura V.58.-Datos de EC_{50} e IC_{50} para LAS

Los resultados obtenidos para el LAS muestran que, el organismo más sensible a sus efecto tóxicos es la *Daphnia magna*. Para éste se obtiene un valor de EC_{50} de 10.09 mg/L. Para el ensayo con Microalgas presenta la menor toxicidad con un valor EC_{50} de 151.07 mg/L, mientras que para bacterias presenta una toxicidad intermedia, EC_{50} 27.58 mg/L.

5.5.8 RESUMEN DE DATOS DE TOXICIDAD

A continuación en la Tabla V.35 y Figura V.59 se muestran todos los datos de toxicidad obtenidos para todos los tensioactivos ensayados con los diferentes ensayos de toxicidad. Se han ordenado de mayor a menor toxicidad utilizando para ello el test con *Daphnia magna*, que es el único que ha sido realizado para todos los tensioactivos ensayados.

Tabla V.35.- Datos de toxicidad para los tensioactivos ensayados

TENSOACTIVO	EC ₅₀ o IC ₅₀ mg/L		
	IC ₅₀ <i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ Algas	EC ₅₀ BACT (15 min)
AKYPO RLM-25	3.48	7.08	3.58
AKYPO RLM-25 + RLM-100	5.04	29.02	17.04
AKYPO LF2 + RLM 25	8.04	78.14	14.96
LAS	10.09	151.07	27.58
OXIDET DM-4	15.46	57.77	3.39
AKYPO RLM-100	18.74	26.01	14.19
GLUCOPON 600	22.42	46.005	15.99
OXIDET DM-20	27.14	155.02	0.354
AKYPO LF1	29.87	76.42	32.76
GLUCOPON 650	39.24	80.505	12.29
AKYPO LF2 + RLM 100	39.31	166.57	54.7
LEVENOL C-421	47.7	--	--
OXIDET L75C	71.24	--	85.86
AKYPO LF4	78.22	331.89	65.75
LEVENOL C-201	91.31	--	--
AKYPO LF2	120.95	76.26	134.6
GLUCOPON 215	124.14	1112.93	35.54
AKYPO LF6	383.44	750.24	211.05

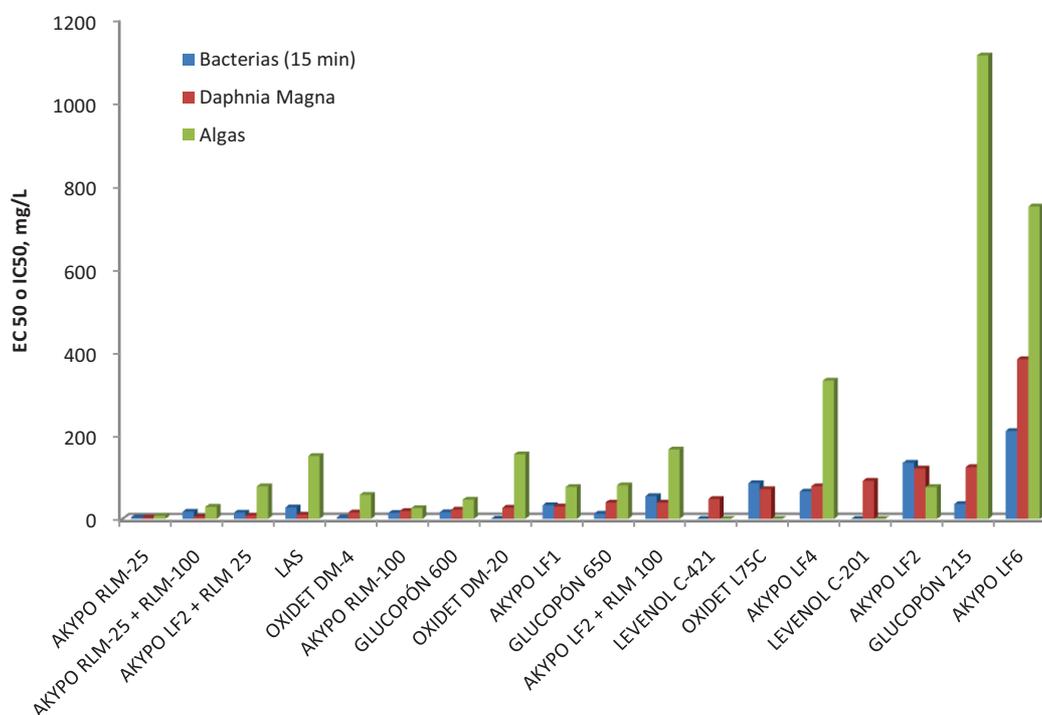


Figura V.59.- Datos de toxicidad para los tensioactivos ensayados

Observando los resultados obtenidos se puede establecer de forma generalizada que las microalgas son las más menos sensibles a los efectos tóxicos de todos los tensioactivos estudiados, a excepción del AKYPO LF2. El GLUCOPON 215 es el que presenta la menor toxicidad con un valor de EC_{50} 1112.93 mg/L, por el contrario el AKYPO RLM-25 presenta la mayor toxicidad para este tipo de test con microalgas, con un valor de EC_{50} de 7.08 mg/L. En la literatura se encuentran un rango de valores de EC_{50} , para tensioactivos no iónicos de 0.21 a 50 mg/L (Anastácio, 2000), valores muy inferiores a los proporcionados en este estudio. Nyholm y Källquist (Nyholm, 1989), encontraron que la gran variación de datos para las mismas especies y el mismo producto testado se debe frecuentemente a las diferencias en el intercambio de CO_2 entre la cubeta de incubación y el aire (Pavlic, 2005).

En la mayoría de los casos, las bacterias luminiscentes son las más sensibles al efecto tóxico del tensioactivo, el más tóxico para este tipo de microorganismos es el OXIDET DM-20, para el que se obtiene un valor de EC_{50} a los 15 minutos de exposición de 0.35 mg/L. Para el AKYPO LF6 se obtiene el mayor valor de EC_{50} (15 min) 211.05 mg/L.

La *Daphnia magna* presenta una sensibilidad intermedia respecto a los otros tipos de test realizados. El tensioactivo más tóxico para ellas es de nuevo el AKYPO RLM-25, con un valor de IC_{50} de 3.48 mg/L, y el menos tóxico el AKYPO LF6 para el que se ha obtenido un valor de IC_{50} de 383.44 mg/L.

De forma general se puede decir que de los tensioactivos estudiados el más tóxico es el AKYPO RLM-25, y los menos tóxicos el AKYPO LF6 y GLUCOPON 215. El resto de tensioactivos presenta toxicidades intermedias, que dependen del organismo de ensayo utilizado.

Estudios indican que la toxicidad de un tensioactivo es altamente específica, no solo por el tipo o clase de tensioactivo, sino por el organismo testado (Ivankovic, 2010), tal y como ocurre para los resultados obtenidos en este estudio.

El LAS, utilizado como tensioactivo de referencia, presenta valores de toxicidad intermedia en el caso de algas y bacterias, mientras que para *Daphnia magna* se obtiene un valor alto de toxicidad, que solo se ve superado por el AKYPO RLM-25.

Para los diferentes grupos de tensioactivos, se observa que la toxicidad es función de su estructura química, así los valores de toxicidad son mayores para los tensioactivos de mayor longitud de cadena carbonada y de menor grado de etoxilación, lo que está de acuerdo con los

resultados obtenidos por Jurado (Jurado, 2009) y con Boeije (Boeije, 2006) que establece que para tensioactivos, la ecotoxicidad normalmente aumenta logarítmicamente con el incremento de la longitud de cadena alquílica.

Para los tensioactivos ensayados también se observa una relación entre la toxicidad y la CMC. Se encuentra que la toxicidad disminuye a medida que aumenta la CMC. Para todos los tensioactivos, excepto para los de la serie LEVENOL, los valores de toxicidad obtenidos están por debajo de la CMC, lo que puede deberse a que los efectos tóxicos generalmente están relacionados con los monómeros libres en lugar de con las micelas (Singer, 1995).

Al comparar los datos obtenidos para las mezclas de AKYPOs con los mismos en forma pura, se obtiene que los datos de EC_{50} obtenidos en el caso de algas son mayores que los que se obtuvieron para cada tensioactivo de forma individual. No ocurre lo mismo para *Daphnia magna* y bacterias, en estos casos se obtienen valores de toxicidad intermedios entre los que presentaban cada uno de los AKYPO que forman la mezcla. De las mezclas de tensioactivos, la menos tóxica es la formada por AKYPO LF2 y RLM-100, los dos tensioactivos que presentan también menor toxicidad de forma individual.

Otro aspecto a destacar es que para el caso de mezclas de tensioactivos, el organismo más sensible es la *Daphnia magna*, a diferencia del caso de tensioactivos puros para los que eran las bacterias *Vibrio fischeri*.

En cuanto a las diferencias de toxicidad entre tensioactivos aniónicos y no iónicos, los resultados no permiten ofrecer ninguna conclusión ya que los tensioactivos aniónicos ensayados abarcan todo el rango de toxicidades estudiado, cuyos valores están condicionados por la estructura del mismo.

Guilhermin (Guihermino, 2000) indican como valor límite de IC_{50} para test con *Daphnia magna* 0.22 mg/L. Por tanto en vista de los resultados, todos los tensioactivos testados presentan una toxicidad aceptable.

VII.- CONCLUSIONES

En este capítulo, se enumeran las conclusiones generales más relevantes obtenidas a partir de los resultados mostrados y de las consideraciones realizadas a lo largo del desarrollo del presente Trabajo Fin de Máster.

1. De los resultados obtenidos de biodegradabilidad mediante el ensayo estático y el seguimiento de la biodegradación mediante el análisis del TOC, se observa que para ácidos alquil éter carboxílicos la biodegradabilidad está influenciada por la longitud de cadena carbonada y grado de etoxilación del tensioactivo, de modo que es mayor para aquellos de menor longitud y mayor grado de etoxilación. La biodegradabilidad también está influenciada por la concentración inicial del tensioactivo en el ensayo, observándose diferente comportamiento según el tensioactivo, así para AKYPO LF2, el aumento de la concentración tiene efecto positivo en la biodegradación, al contrario que ocurre para AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100.
2. De los perfiles de biodegradación obtenidos para los ácidos alquil éter carboxílicos, AKYPO LF2, AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100, se han determinado los parámetros característicos del proceso de biodegradación, tales como el tiempo de latencia, tiempo de vida media, velocidad media de degradación, concentración de tensioactivo residual, y biodegradabilidad. Estos parámetros se modifican con la concentración del tensioactivo produciéndose una disminución de la velocidad del proceso de biodegradación y de la biodegradabilidad última al aumentar la concentración inicial de tensioactivo en el ensayo.

El tiempo de latencia aumenta con el grado de etoxilación, ya que las cadenas etoxiladas de mayor tamaño muestran un aumento de la bioresistencia. Para AKYPO LF2, el tiempo de latencia permanece constante al aumentar la concentración, mientras que para AKYPO RLM-25 y RLM-100 no se observa una tendencia determinada al modificar la concentración.

3. Se ha evaluado la biodegradación final para los ácidos alquil éter carboxílicos, AKYPO LF2, AKYPO RLM-25 y AKYPO RLM-100, midiendo la DBO mediante respirometría. Para los perfiles de biodegradación obtenidos se han estimado: el parámetro cinético de tasa específica de crecimiento, el tiempo de latencia y la mineralización final.

Se observa que el tiempo de latencia aumenta con la concentración y que la tasa específica de crecimiento de los microorganismos disminuye con dicho aumento.

Se obtienen los mayores valores de tasa de crecimiento para AKYPO RLM-100, de mayor longitud de cadena y grado de etoxilación, y los menores para AKYPO LF2 de menor longitud de cadena carbonada. Admitiendo la clasificación de biodegradabilidad según Blok (Blok, 1996), se ha determinado que: el tensioactivo AKYPO RLM-100 de mayor grado de etoxilación puede considerarse como fácilmente biodegradable. El AKYPO RLM-25 se considera de biodegradabilidad inherente para concentraciones superiores a 5 mg/L y fácilmente biodegradable a concentraciones inferiores, y que el tensioactivo AKYPO LF2 se considera de biodegradabilidad inherente para todas las concentraciones ensayadas.

4. Se ha evaluado la biodegradación final para los alquilpoliglucósidos GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 y GLUCOPON 650 midiendo la DBO mediante respirometría. Para los perfiles de biodegradación obtenidos se han estimado: el parámetro cinético de tasa específica de crecimiento, el tiempo de latencia y la mineralización final. El tiempo de latencia para los alquilpoliglucósidos aumenta al incrementar la concentración de tensioactivo obteniéndose el menor valor para GLUCOPON 215, de menor longitud de cadena carbonada y el mayor para GLUCOPON 600, de mayor longitud, para los que se alcanzan los mayores y menores porcentajes de mineralización respectivamente.

Se obtiene mayor biodegradabilidad para el tensioactivo de menor longitud de cadena, GLUCOPON 215, a las concentraciones iniciales inferiores, 15 mg/L, 25 mg/L y 50 mg/L, mientras que para concentraciones superiores 75 mg/L y 100 mg/L, el más biodegradable es el GLUCOPON 650, que presenta longitud de cadena intermedia entre los alquilpoliglucósidos ensayados. El de menor biodegradabilidad en todos los casos es el GLUCOPON 600 de mayor longitud de cadena y número de moléculas de glucosa. De acuerdo con los datos de tasa específica de crecimiento obtenidos y admitiendo la clasificación de biodegradabilidad según Blok (Blok, 1996), se ha determinado que: los tres alquilpoliglucósidos ensayados, GLUCOPON 215, GLUCOPON 600 y GLUCOPON 650 se pueden clasificar como de biodegradabilidad inherente en el rango de concentraciones estudiadas de 15 a 100 mg/L.

5. Mediante los perfiles de biodegradación para los alcoholes grasos etoxilados FINDET 1214N/23 y FINDET 1618A/18 se comprueba que: la concentración inicial de tensioactivo en el ensayo influye en la velocidad de biodegradación y en la biodegradación final alcanzada, que se produce la biodegradación preferente del tensioactivo de mayor longitud de cadena alquílica y mayor grado de etoxilación y que la biodegradación está influenciada por la CMC, alcanzándose mayor biodegradabilidad para el tensioactivo de menor CMC, FINDET 1618A/18. A partir de los perfiles se determinaron los parámetros característicos del proceso de biodegradación, tales como tiempo de latencia, tiempo de vida media, velocidad media de degradación, concentración de tensioactivo residual, y biodegradabilidad, observándose una disminución notable de la velocidad de biodegradación y un aumento considerable del tiempo de vida medio y de latencia a altas concentraciones iniciales de tensioactivo.

6. Se ha seguido el crecimiento de la biomasa para alcoholes grasos etoxilados mediante el método de recuento de las unidades formadora de colonias. Se obtuvo mayor crecimiento de biomasa para tensioactivos de menor longitud de cadena y mayor grado de etoxilación y el crecimiento de la biomasa es también mayor a concentraciones de tensioactivo mayores.

Se han definido y evaluado los parámetros característicos de las curvas de crecimiento de microorganismos durante el proceso de biodegradación como la velocidad específica de crecimiento k , el número máximo de unidades formadoras de colonias UFC/ml_{max} , y el rendimiento de producción de biomasa por gramo de tensioactivo Y_{ap} . La velocidad específica de crecimiento (k) no se ve afectada por la concentración inicial y sí por el tipo de tensioactivo, obteniéndose menor velocidad para el de mayor longitud de cadena y menor grado de etoxilación, FINDET 1618A/18. En cuanto al rendimiento de producción de biomasa Y_{ap} , se ve incrementado por el aumento en la concentración de tensioactivo, y es mayor para el tensioactivo de menor longitud de cadena, FINDET 1214N/23. Se encuentra también que para la misma concentración de tensioactivo, Y_{ap} es menor para el tensioactivo de menor CMC, debido a la formación de micelas y por lo tanto la baja presencia de tensioactivo libre en el medio.

7. La determinación de la toxicidad mediante el ensayo con bacterias luminiscentes de la cepa *Vibrio fischeri*, microcrustáceos *Daphnia magna* y microalgas *Selenastrum capricornutum*, indica que las microalgas son el organismo menos sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos con un rango de EC_{50} entre 7.08 y 1112.93 mg/L, mientras que las bacterias son las más sensibles, EC_{50} entre 0.354 y 211.05 mg/L. La *Daphnia magna* presenta una sensibilidad intermedia para la mayoría de los casos, IC_{50} entre 3.48 y 383.44 mg/L.

8. Para los diferentes grupos de tensioactivos estudiados, se observa que la toxicidad es función de su estructura química, así los valores de toxicidad son mayores para los tensioactivos de mayor longitud de cadena carbonada y de menor grado de etoxilación.

Para ácidos alquil éter carboxílicos y alquilpoliglucósidos, si se analizan conjuntamente los datos de toxicidad con los resultados de biodegradación última, se observa que la biodegradación es menor para aquellos de mayor longitud de cadena y menor grado de etoxilación. Por tanto no se cumple la premisa general de que los tensioactivos más tóxicos resultan ser los más biodegradables, siendo el AKYPO RLM-25 y el GLUCOPON 600 los menos biodegradables y a la vez los más tóxicos de sus respectivas series.

9. Se ha establecido una correlación para ácidos alquil éter carboxílicos, alquilpoliglucósidos, óxidos de amina y ésteres de glicerina polietoxilados entre toxicidad y CMC, encontrándose que la toxicidad disminuye con el aumento de dicho parámetro. Además se observa que en todos los casos, a excepción de los ésteres de glicerina polietoxilados, los valores de toxicidad están por debajo de la CMC, debido a que los efectos tóxicos de los tensioactivos generalmente están relacionados con los monómeros libres en lugar de con las micelas.

10. De las mezclas de AKYPOs ensayadas se obtiene: que las microalgas *Selenastrum capricornutum* son menos sensibles a los efectos tóxicos de las mezclas que de los tensioactivos de forma individual, que para *Daphnia magna* y bacterias se obtienen valores de toxicidad intermedios entre los que presentaban cada uno de los AKYPO que forman la mezcla y que para las mezclas el organismo más sensible es la *Daphnia*

magna, a diferencia del caso de AKYPOs puros para los que son las bacterias *Vibrio fischeri*. También se obtiene que la mezcla menos tóxica es la formada por los tensioactivos que presentan menor toxicidad de forma individual, AKYPO LF2 y AKYPO RLM-100.

11. De todos los tensioactivos ensayados el más tóxico es el AKYPO RLM-25, y los menos tóxicos son el AKYPO LF6 y GLUCOPON 215. El resto de tensioactivos presenta toxicidades intermedias, que dependen del organismo de ensayo utilizado. Para los ácidos alquil éter carboxílicos el más tóxico es el AKYPO RLM-25, con un valor de IC_{50} para *Daphnia magna* de 3.48 mg/L, para los alquilpoliglucósidos es el GLUCOPON 600, IC_{50} de 22.42 mg/L, para los óxidos de amina el OXIDET DM-4, IC_{50} de 15.46 mg/L, y para los ésteres de glicerina polietoxilados el LEVENOL C-421, IC_{50} de 42.77. Para el LAS se obtuvo un valor de IC_{50} con *Daphnia magna* de 10.09 mg/L.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- Abbott, D.C. (1962). The colorimetric determination of anionic surface-active materials in water. *Analyst* 87: 286-293.
 - Altmajer, D. (2004). Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de Lavado. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
 - Anastácio, P.M., Holten Lützhøft, H.-C., Halling-Sørensen, B., Marques, J.C., (2000). Surfactant (Genapol OX-80) toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere* 40, 835–838.
 - Bailón, R. (2003). Ingeniería del Conocimiento y Vigilancia Tecnológica Aplicada a la Investigación en el Campo de los Tensioactivos. Desarrollo de un Modelo Ciencimétrico Unificado. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
 - Blok, J. y Struys, J. (1996). Measurement and validation of kinetic parameter values for prediction of biodegradation rates in sewage treatment. *Ecotoxicol. Environ. Safte*. 33: 217-227.
 - BOE (1985). Orden de 5 de Septiembre de 1985. BOE nº 260 de 30 de Octubre de 1985 y correcciones en BOE nº 311 del 28 de Diciembre de 1985.
 - BOE (1986). Ley de Aguas 29/1985. BOE nº 103 de 30 de Abril de 1986.
 - BOE (1988). Orden de 11 de Mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de agua superficiales cuando son destinadas a la producción de agua potable. BOE nº 124 de 24 de Mayo de 1988.
 - BOE (1990). Real Decreto 1138/90 de 14 de Septiembre de 1990 por el que se aprueba la Reglamentación técnico sanitaria para abastecimiento y control de la calidad de las aguas potables. BOE nº 226 del 20 de Septiembre de 1990.
 - BOE (1995). Real Decreto 363/1995 de 10 de marzo por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. BOE nº 133 de 05 de Junio de 1995.
 - BOE (1999). Real Decreto 770/1999 de 7 de Mayo por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes limpiadores. BOE nº 118 de 18 de Mayo de 1999.
 - Boeije, G. M., Cano, M. L., Marshall, S. J., Belanger, S. E., Van Compernelle, R., Dorn, P. B., Gümbel, H., Toy, R. & Wind, T. (2006). Ecotoxicity quantitative structure-activity relationships for alcohol ethoxylate mixtures based on substance-specific toxicity predictions. *Ecotoxicol. Environ. Safte*. 64, 75–84.

-
- BOJA (1996). Decreto de 16 de Enero por el que se aprueba el reglamento de la calidad para las aguas litorales. BOJA nº 19 de 8 de Febrero de 1996.
 - BOJA (1997). Orden de 14 de Febrero de 1997 por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos. BOJA nº 27 de 1997 de 4 de Marzo de 1997.
 - Bravo, V., Jurado, E., Reyes, A., García López, A., Bailón-Moreno, R., Cuevas, M. (2005). Determination of Average Molecular Weight of Commercial Surfactants: Alkylpolyglucosides and Fatty Alcohol Ethoxylates. *J. Surfactants Deterg.* 8:341-346.
 - CEE (1973a). Directiva 73/404/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materias de detergentes (DO L 347 de 17/12/1973).
 - CEE (1973b). Directiva 73/405/CEE del consejo referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos (DO L 109 de 17/12/1973).
 - CEE (1982a). Directiva 82/243/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/18 de 1982.
 - CEE (1982b). Directiva 82/242/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos. Bruselas. Bélgica. DO L 109/1 de 1982.
 - CEE (1986). Directiva 86/94/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos (DO L 80 de 25/3/1986).
 - Cella, JA., Harrimzn, LA., Eggenberg, DN., Harwood, HJ. (1955). The relationship of charge density, antibacterial activity and micelle formation of quaternary ammonium salts. *J. Am. Chem. Soc.* 1955; 77:4264-6.
 - Comité European des Agents de Surface et de Leurs Intermediaries (CESIO) (2008). CESIO surfactants statistics for Western Europe 2007. *CESIO News Issue 12/2008.*
 - Crabb, N. y Persinger, H. (1964). The determination of poly(oxyethylene) nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41: 752-755.

- Csherháti, T., Forgács, E., OROS, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ. Int.* 28: 337-348.
- Deleu, M. y Paquot, M. (2004). From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C.R. Chim.* 7.
- Dobarganes, M.C. (1975). Estudios sobre la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla.
- Edser C. (2006). Latest market analysis. *Focus on Surfactants*; 5:1-2.
- Farré, M., García, M., Tirapu, L., Ginebreda, A. and Barceló, D. (2001). Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert[®] and Microtox[®] bioluminescence inhibition assays. *Anal. Chim. Acta.* 427 (2), 181-189.
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C. y Solans, C. (2002). The relation between phase behavior and formation of narrow size distribution W/O emulsions. *J. Dispersion Sci. Technol.* 23(1-3): 209-217.
- García, M., Ribosa, I., Campos, E., Sánchez-Leal, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere* 35(3): 545-556.
- García, M.T., Campos, E., Ribosa, I. (2007). Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere*; 69:1574-8.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M.C., and Soares, A. M. V. M. (2000). Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46, 357-362.
- Hedreul, C. y Frens, G. (2001). Foam stability. *Colloids Surf., A.* 186(1-2): 73-82.
- Ivankovic. T., Hrenovic. J. (2010) Review: J. Surfactants in the environment. *Arth Hig Rada Toksikol*; 61:95-110.
- INE, 2006. Instituto Nacional de Estadística.
- Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2002). Comparison and use of methods for the determination of non-ionic surfactants in biodegradation processes, *T. Surfactants Detergent* 39 154-159.
- Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2006) Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants:

applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests, *Chemosphere* 65 278-285.

– Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters, *J. Surfactants Deterg.* 10 145-153.

– Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2009). Acute toxicity and relationship between metabolites and ecotoxicity during the biodegradation process of non-ionic surfactants: fatty-alcohol ethoxylates, nonylphenol polyethoxylate and alkylpolyglucosides. *Water Sci. Technol.* 59.12, 2351-2358.

– Karpińska-Smulikowska, J., Moskal, J. (2004). Toxic effect of non-ionic phosphoorganic surfactants on selected organisms representing aquatic biocenosis. *Acta Toxicol.* 12:61-66.

– Kiermeier, F., Mrozek, H. Coordinador Gerhard Wildbrett, (2000). Limpieza y Desinfección en la industria alimentaria. *Ed. Acribia S. A., Zaragoza.* (España).

– Kimerle, R.A., Swisher, R.D. (1977). Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Res.* 11: 31-37.

– Krogh, K., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B. y Vejrup, P. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactants adjuvants in pesticide: a review. *Chemosphere.* 50:871-901.

– Kunieda, H., Ozawa, K., Aramaki, K., y Solans, C. (1998). Formation of microemulsions in mixed ionic-nonionic surfactants systems. *Langmuir* 14(2): 260-263.

– Lechuga, M. (2005). Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales. *Tesis Doctoral.* Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.

– Lein, E.J., Perrin, J.H. (1976). Effect of chain length on critical micelle formation and protein binding of quaternary ammonium compounds. *J. Med Chem;* 19:849-50.

– Li, H., Schröede, F. (2000). Surfactants-standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water Sci Technol.* 42:391-398.

– Martín, G.R. (1995). Compuestos orgánicos en las aguas. *Ingeniería Química* 6: 159-165.

– Matthijs, E. y Hennes, E.C. (1991). Determination of surfactants in environmental samples. *Tenside, Surfactants Deterg.* 28(1): 22-27.

-
- Morrall, D., Belanger, S., Dunphy, J. (2003). Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56:381-3893.
 - Nielsen, A., Borch, K., Westh, P. (2000). Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochim. Biophys Acta, Biomembr. Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1497:321-331.
 - Nyholm, N., Källquist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 689–703.
 - OECD (1971). Pollution by Detergents: Determination of the Biodegradability of Anionic Synthetic Surface Active Agents, OECD. Paris. Francia.
 - OECD (1976). Environment Directorate. Proposed Method for the Determination of the Biodegradability of Surfactants used in a Synthetic Detergents, OECD. Paris. Francia.
 - OECD (1981). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Sección 3: Degradation and Acumulation, OECD. Paris. Francia.
 - OECD (1984a). OECD Guideline for Testing of Chemicals, 202. *Daphnia* sp reproduction test. OECD. Paris. Francia
 - OECD (1984b). OECD Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, growth inhibition test. OECD. Paris. Francia
 - OECD (1993a). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Section 3: Degradation and Acumulation, OECD. Paris. Francia.
 - OECD (1993b). OECD Guideline for Testing of Chemicals, “Ready Biodegradability”, OECD. Paris. Francia.
 - Ortega, M. (2009). Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. *Tesis Doctoral.* Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
 - Pavlic, Z., Vidakovic-Cifrek, Z., Puntaric, D. (2005). Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*, 61:1061-1068.
 - Ramírez-Duarte, W.F, Rondón-Barragán, I.S, Eslava-Mocha, P.R. (2002). Surfactants associated to herbicides: Effects in aquatic organisms. *Orinoquia*, Vol.9 pp.45-59.

-
- Rand, G. (1995). *Aquatic Toxicology: Effects, Environmental fate and Risk Assessment*. Gary M. Rand (Ed). 1083 p.
 - Reuschenbach, P., Pagga, U. y Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Res.* 37: 1571-1582.
 - Reglamento CE nº 648, (2004). Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes. (DO L 104, 08.04.2004)
 - Reglamento CE nº 907, (2006). Reglamento (CE) nº 907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se modifica el Anexo III: Métodos de ensayo de biodegradabilidad y Anexo VII – Etiquetado y hoja informativa de ingredientes. (DO L 168, 21.6.2006).
 - Reglamento CE nº 1271, (2008). Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas”. (DO L 353, 31.12.2008).
 - Reglamento CE nº 1271 (2008). Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 235, 05.09.2008).
 - Reglamento CE nº 1336, (2008). Reglamento (CE) nº 1336/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, que modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 para adaptarlo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 354, 31.12.2008).
 - Reglamento CE nº 551 (2009). Reglamento (CE) nº 551/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se modifica el Anexo V – Lista de tensioactivos objeto de excepción, y Anexo VI-Lista de tensioactivos de detergentes prohibidos o limitados (DO L 164, 26.6.2009).
 - Reglamento CE nº 790 (2009). Reglamento (CE) nº 790/2009 de la Comisión, de 10 de agosto de 2009, que modifica, a efectos de su adaptación al progreso técnico y científico, el
 - Ribosa, I., García, M.T., Sánchez-Leal, J. y González, J.J. (1993). *Photobacterium Phosphoreum* test data of non-ionic surfactants. *Toxicol. Environ. Chem.* 39(3-4): 273-241.
 - Richterich, K. y Steber, J. (2001). The time-window- an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. *Chemosphere* 44: 1649-1654.

- Sabahi, N. (2004). Caracterización de Tensioactivos: Poder Espumante y Tensiones Superficiales. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Sánchez-Leal, J. (1995). Aspectos ecológicos de los detergentes, (1ª Edición). GPE: Colección temas medioambientales. Gestión y Promoción Editorial, S.A. Barcelona. España.
- Sandbacka, M., Christianson, I. y Isomaa, B. (2000). The Acute toxicity of surfactants on Fish Cells, *Daphnia magna* and Fish – A comparative Study. *Toxicol. in Vitro* 14: 61-68.
- Sibila, M.A (2008a). Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino. *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Sibila, M.A., Garrido, M.C., Perales, J.A., Quiroga, J.M. (2008b). Ecotoxicity and biodegradability of an alkyl ethoxysulphate surfactants in coastal waters. *Sci. Total. Environ*; 394:265-74.
- Singer, M.M., George, S., Tjeerdema, R.S. (1995). Relationship of some physical of oil dispersant and their toxicity to marine organisms. *Environ. Contamination. Toxicol.* 29, 33-38.
- Szymanski, A., Wyras, B., Zbigniew, S., Jaroszynski, T. y Lukaszewski, Z. (2000). Biodegradation of fatty alcohol ethoxylates in the continuous flow activated sludge test. *Water Res.* 34(16): 4101-4109
- Solans, C., Pinazo, A., Caldero, G. y Infante, M. (2001). Highly concentrated emulsions as novel reaction media. *Colloids Surf., A.* 176(1): 101-108.
- Struijs, J. y Stoltenkamp, J. (1994). Testing surfactants for ultimate biodegradability. *Chemosphere* 28(8): 1503-1523.
- Tu, M., Randall, J. (2003). *Weed Control Methods Handbook*, The Nature Conservancy. Chapter 8-Adjuvants.
- Umsicht, F.I., 2003. Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants. *Oberhausen*.
- UNE 55-844-91 (NORMA UNE 55-844-91). Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE EN ISO 11348-2 (NORMA UNE EN ISO 11348-2). Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de *vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes).

-
- UNE EN 903 (NORMA UNE EN 903). Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM (ISO 7875-1:1984, modificada) (versión oficial en 903: 1993).
 - UNE-EN ISO 6341:1996 (NORMA UNE EN ISO 6341:1996). Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* straus. (*Cladocera crustácea*). Ensayo de Toxicidad aguda.
 - UNE-EN 28692: 1994 (NORMA UNE EN 28692:1994). Calidad del Agua: Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con *Scenedesmus subspicatus* y *Selenastrum capricornutum*.
 - Uppgård, L., Sjöström, M., Wold, S. (2000). Multivariate quantitative structure-activity relationships for the aquatic toxicity of alkyl polyglucosides. *Tenside, Surfactants, Deterg.* 37:131-138.
 - Mezzanotte, V., Castiglioni, F., Todeschini, R., Pavan, M. (2003). Study on anaerobic and aerobic degradation of different non-ionic surfactants, *Bioresour. Technol.* 87:87-91.
 - Willing, A., Messinger, H., Aulumann, W. (2004). Ecology and toxicology of alkyl polyglycosides. *Handbook of Detergents, Part B: Environmental Impact*. Marcel Dekker, New York.
 - Ying, G.G. (2006). Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int.* 32:417-31.
 - Xiao, J., Sivars, U., Tjerneld, F. (2000). Phase behavior and protein partitioning in aqueous two-phase systems of cationic-anionic surfactants mixture. *J.Chromatogr. B.* 743-327:338.

ÍNDICE DE TABLAS

I. OBJETIVOS-----	5
II.- INTRODUCCIÓN -----	11
Tabla II.1 Principales tipos de tensioactivos utilizados (Sibila, 2008a)-----	15
Tabla II. 2.- Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (Ortega, 2009) -----	18
Tabla II. 3.- Composición de algunos detergentes (Bailón, 2003)-----	20
Tabla II. 4.- Concentraciones medias de tensioactivos aniónicos (MBAS) y de tensioactivos no iónicos (BiAS) en EDARs y en aguas de río -----	23
Tabla II. 5.- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad total (mineralización) de compuestos.-----	35
Tabla II. 6.- Valores de IC ₅₀ (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a <i>Daphnia magna</i> -----	46
Tabla II. 7.- Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC ₅₀) y frente a <i>Daphnia magna</i> (IC ₅₀) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados -----	47
III.- MATERIALES Y MÉTODOS -----	51
Tabla III.1: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados-----	53
Tabla III.2: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados-----	54
Tabla III.3: Propiedades de los alcoholes grasos etoxilados utilizados-----	54
Tabla III.4: Propiedades de los óxidos de amina utilizados-----	55
Tabla III.5: Propiedades de los ésteres de glicerina polietoxilados utilizados-----	55
IV.- RESULTADOS EXPERIMENTALES -----	93
Tabla IV.1- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para AKYPO LF2 -----	95
Tabla IV.2- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para AKYPO RLM25-----	96
Tabla IV.3- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para AKYPO RLM100 -----	96
Tabla IV.4- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para AKYPO LF2 -----	96
Tabla IV.5- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para AKYPO RLM25 -----	97
Tabla IV.6- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para AKYPO RLM100-----	98
Tabla IV.7 Ensayo Respirométrico de Biodegradación para GLUCOPON 215 -----	100
Tabla IV.8- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para GLUCOPON 600 -----	101

Tabla IV.9- Ensayo Respirométrico de Biodegradación para GLUCOPON 650 -----	102
Tabla IV.10- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para FINDET 1214N/23-----	103
Tabla IV.11- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para FINDET 1618A/18-----	104
Tabla IV.12- Ensayo Estático de Biodegradabilidad para LAS -----	105
Tabla IV.13- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO LF1 -----	106
Tabla IV.14- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO LF2 -----	107
Tabla IV.15- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO LF4 -----	107
Tabla IV.16- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO LF6 -----	108
Tabla IV.17- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO RLM25-----	108
Tabla IV.18- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para AKYPO RLM100-----	109
Tabla IV.19- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO LF1-----	109
Tabla IV.20- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO LF2-----	110
Tabla IV.21- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO LF4-----	110
Tabla IV.22- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO LF6-----	110
Tabla IV.23- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO RLM25 -----	111
Tabla IV.24- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para AKYPO RLM-100 -----	111
Tabla IV.25- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO LF1-----	111
Tabla IV.26- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO LF2-----	112
Tabla IV.27- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO LF4-----	112
Tabla IV.28- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO LF6-----	112
Tabla IV.29- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO RLM-25 -----	113
Tabla IV.30- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con AKYPO RLM-100-----	113
Tabla IV.31- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias <i>Vibrio Fischeri</i> para mezcla de AKYPO LF2 y AKYPO RLM-100 (1:1)-----	114
Tabla IV.32- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias <i>Vibrio Fischeri</i> para mezcla de AKYPO LF2 y AKYPO RLM-25 (1:1) -----	114
Tabla IV.33- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias <i>Vibrio Fischeri</i> para mezcla de AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25 (1:1) -----	115
Tabla IV.34- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para mezcla de tensioactivos AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)-----	115

Tabla IV.35- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para mezcla de tensioactivos AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25 (1:1) -----	116
Tabla IV.36- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para mezcla de tensioactivos AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25 (1:1) -----	116
Tabla IV.37- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivos AKYPO LF2 + AKYPO RLM-100 (1:1)-----	116
Tabla IV.38- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivos AKYPO LF2 + AKYPO RLM-25(1:1)-----	117
Tabla IV.39- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con mezcla de tensioactivos AKYPO RLM-100 + AKYPO RLM-25(1:1)-----	117
Tabla IV.40- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para GLUCOPON 215-----	118
Tabla IV.41- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para GLUCOPON 600-----	118
Tabla IV.42- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para GLUCOPON 650-----	119
Tabla IV.43- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para GLUCOPON 215 -----	119
Tabla IV.44- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para GLUCOPON 600 -----	119
Tabla IV.45- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para GLUCOPON 650 -----	120
Tabla IV.46- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 215 -----	120
Tabla IV.47- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 600 -----	120
Tabla IV.48- Medida de la inhibición del Crecimiento para algas con GLUCOPON 650 -----	121
Tabla IV.49- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para OXIDET DM4-----	122
Tabla IV.50- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para OXIDET DM20-----	122
Tabla IV.51- Medida de la inhibición de la Luminiscencia de bacterias para OXIDET L75C-----	123
Tabla IV.52- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para OXIDET DM4 -----	123
Tabla IV.53- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para OXIDET DM20 -----	123
Tabla IV.54- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para OXIDET L75C-----	124
Tabla IV.55- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con OXIDET DM-4-----	124
Tabla IV.56- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con OXIDET DM-20 -----	124
Tabla IV.57- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para LEVENOL C-201 -----	125
Tabla IV.58- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para LEVENOL C-421-----	125
Tabla IV.59- Medida de la muerte o inmovilización de <i>Daphnia magna</i> para LAS -----	126
Tabla IV.60- Medida de la inhibición del Crecimiento para Algas con LAS-----	126

V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	129
Tabla V.1: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados.....	131
Tabla V.2.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los ácidos alquil éter carboxílicos	137
Tabla V.3.- Equivalencia entre la concentración de los ácidos alquiletercarboxílicos en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico	141
Tabla V.4.-Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para ácidos alquil éter carboxílicos por el método respirométrico	143
Tabla V.5: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados	145
Tabla V.6.- Equivalencia entre la concentración de los APG en mg/L y su concentración expresada como demanda teórica de oxígeno y en mg C/L para el ensayo respirométrico	149
Tabla V.7.-Parámetros cinéticos característicos del proceso de biodegradación para APG por el método respirométrico	151
Tabla V.8: Propiedades de los alcoholes grasos etoxilados utilizados	153
Tabla V. 9.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los AGE	158
Tabla V.10.- Parámetros característicos de las curvas de crecimiento de biomasa para AGE	164
Tabla V. 11.- Algunos resultados de biodegradación de LAS en ensayos con medio sintético y bajas concentraciones de inóculo (Perales, 2001).....	165
Tabla V.12.- Parámetros característicos para el perfil de biodegradación del LAS.....	166
Tabla V.13: Propiedades de los ácidos alquil éter carboxílicos utilizados.....	170
Tabla V.14.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes.....	173
Tabla V.15.-Datos de IC ₅₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i>	176
Tabla V.16.-Datos de IC ₅₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas.....	179
Tabla V.17.-Resumen datos de toxicidad para ácidos alquil éter carboxílicos	179
Tabla V.18.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes	183
Tabla V.19.-Datos de IC ₅₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i>	185

Tabla V.20.-Datos de IC ₅₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas-----	187
Tabla V.21.-Resumen datos de toxicidad para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos -----	187
Tabla V.22: Propiedades de los alquilpoliglucósidos utilizados-----	188
Tabla V.23.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con bacterias luminiscentes-----	190
Tabla V.24.-Datos de IC ₅₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	192
Tabla V.25.-Datos de IC ₅₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con microalgas-----	194
Tabla V.26.-Resumen datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos-----	194
Tabla V.27: Propiedades óxidos de amina utilizados -----	197
Tabla V.28.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para óxidos de amina mediante ensayo con bacterias luminiscentes -----	198
Tabla V.29.-Datos de IC ₅₀ para óxidos de amina mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	200
Tabla V.30.-Datos de IC ₅₀ para mezclas de óxidos de amina mediante ensayo con microalgas-----	201
Tabla V.31.-Resumen datos de toxicidad para óxidos de amina -----	202
Tabla V.32: Propiedades de los ésteres de glicerina polietoxilados utilizados-----	204
Tabla V.33.-Datos de IC ₅₀ para ésteres de glicerina polietoxilados mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	205
Tabla V.34.-Datos de EC ₅₀ e IC ₅₀ para LAS-----	207
Tabla V.35.- Datos de toxicidad para los tensioactivos ensayados -----	208
VII.- CONCLUSIONES-----	213
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	221

ÍNDICE DE FIGURAS

I. OBJETIVOS-----	5
II.- INTRODUCCIÓN -----	11
Figura II. 1.- Estructura básica de un tensioactivo-----	13
Figura II. 2.- Propiedades de los tensioactivos -----	16
Figura II.3.- Modificación de las propiedades en función de la concentración de tensioactivo-----	18
Figura II.4.- Consumo mundial de tensioactivos durante el año 2006 (Janshekar y col.,2006).-----	21
Figura II.5. Evolución del consumo de tensioactivos en España durante los años 1996-2006.-----	21
Figura II.6.- Vías de emisión de detergentes al medio ambiente -----	22
III.- MATERIALES Y MÉTODOS -----	51
Figura III. 1.- Protocolo de muestreo para el ensayo estático de biodegradación -----	61
Figura III. 2.- Representación esquemática del equipo respirométrico-----	64
Figura III. 3.- Recta de calibrado para el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno -----	68
Figura III.4.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro-----	70
Figura III.5.- Diagrama de Flujo TOC-----	71
Figura III.6- Especificaciones TOC -----	72
Figura III.7- Visión interior del equipo de medición del TOC-----	73
Figura III.8.- Relación lineal entre la función Γ y la concentración para el tensioactivo AKYPO LF1 ----	80
Figura III. 9.- Relación lineal entre % Efecto y la concentración para el tensioactivo OXIDET DM-20---	84
Figura III. 10.- Relación lineal entre % Inhibición y la concentración para el tensioactivo AKYPO LF2--	90
IV.- RESULTADOS EXPERIMENTALES -----	93
V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	129
Figura V.1.- Variación del TOC residual y del porcentaje de biodegradación final con el tiempo para los AKYPO ensayados a 5 mg/L y 15 mg/L -----	133
Figura V.2.- Variación del TOC residual y del porcentaje de biodegradación final con el tiempo para los AKYPO ensayados a 25 mg/L y 50 mg/L -----	134

Figura V.3.- Influencia de la concentración de tensioactivo durante el proceso de biodegradación: evolución del porcentaje de TOC residual y porcentaje de biodegradación final en función del tiempo para los AKYPO ensayados-----	135
Figura V.4.- Efecto de la concentración en el tiempo de latencia para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.-----	138
Figura V.5.- Efecto de la concentración en la velocidad media de biodegradación para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.-----	139
Figura V.6.- Efecto de la concentración en la Mineralización final para los diferentes ácidos alquil éter carboxílicos.-----	139
Figura V.7.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes AKYPO-----	140
Figura V.8.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok (Blok.1996)-----	142
Figura V.9.- Efecto de la concentración sobre el tiempo de Latencia para ácidos alquil éter carboxílicos.-----	143
Figura V.10.- Influencia de la concentración en la Tasa específica de crecimiento (μ) de microorganismos para AKYPO-----	144
Figura V.11.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG-----	146
Figura V.12.-Curvas de DBO y biodegradabilidad última por el método respirométrico para diferentes APG, a la misma concentración inicial de sustrato-----	147
Figura V.13.- Curva típica de consumo de oxígeno. Determinación de los parámetros cinéticos de acuerdo con Blok (Blok,1996)-----	150
Figura V-14.- Influencia de la concentración en la tasa específica de crecimiento (μ) de microorganismos para alquilpoliglucósidos-----	152
Figura V.15.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación con el tiempo para los AGE ensayados-----	155
Figura V. 16.- Determinación gráfica del tiempo de latencia sobre la curva de biodegradación-----	157
Figura V. 17.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para FINDET 1214N/23 a 50 mg/L y 100 mg/l de concentración inicial-----	160
Figura V. 18.- Evolución del número de UFC/ml durante los ensayos de biodegradación para los tensioactivos FINDET 1214N/23 y FINDET 1618A/18 a 50 mg/L de concentración inicial-----	161

Figura V. 19.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1214N/23 con concentración inicial de 50 mg/L -----	162
Figura V. 20.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1214N/23 con concentración inicial de 100 mg/L-----	162
Figura V. 21.- Curvas de crecimiento y perfiles de biodegradación para el tensioactivo FINDET 1618A/18 con concentración inicial de 50 mg/L -----	163
Figura V. 22.- Variación de la concentración de tensioactivo residual y del porcentaje de biodegradación para el LAS, 5 mg/L -----	166
Figura V.23.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos AKYPO ---	171
Figura V.24.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes-----	173
Figura V.25.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	174
Figura V.26.-Datos de IC ₅₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	176
Figura V.27.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo-----	177
Figura V.28.-Datos de EC ₅₀ para ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas ----	179
Figura V.29.-Resumen datos de toxicidad para ácidos alquil éter carboxílicos -----	180
Figura V.30- Variación de la toxicidad con la CMC. -----	181
Figura V.31.-Linealización entre la función gamma y la concentración para mezclas de tensioactivos AKYPO-----	182
Figura V.32.-datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con bacterias luminiscentes -----	183
Figura V.33.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	184
Figura V.34.-Datos de IC ₅₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	185
Figura V.35.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo-----	186
Figura V.36.-Datos de EC ₅₀ para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos mediante ensayo con microalgas-----	187
Figura V.37.-Resumen datos de toxicidad para mezclas de ácidos alquil éter carboxílicos -----	188
Figura V.38.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos GLUCOPON -----	189

Figura V.39.-Datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con bacterias luminiscentes-----	190
Figura V.40.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	191
Figura V.41.-Datos de IC ₅₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	192
Figura V.42.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo-----	193
Figura V.43.-Datos de EC ₅₀ para alquilpoliglucósidos mediante ensayo con microalgas-----	194
Figura V.44.-Resumen datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos-----	195
Figura V.45.- Variación de la toxicidad con la CMC y longitud de la cadena alquílica (R) -----	196
Figura V.46.-Linealización entre la función gamma y la concentración para tensioactivos OXIDET---	197
Figura V.47.-datos de EC ₅₀ y EC ₂₀ para óxidos de amina mediante ensayo con bacterias luminiscentes -----	198
Figura V.48.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	199
Figura V.49.-Datos de IC ₅₀ para óxidos de amina mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	200
Figura V.50.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo-----	201
Figura V.51.-Datos de EC ₅₀ para óxidos de amina mediante ensayo con microalgas-----	202
Figura V.52.-Resumen datos de toxicidad para óxidos de amina -----	202
Figura V.53.- Variación de la toxicidad con la CMC -----	203
Figura V.54.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	204
Figura V.55.-Datos de IC ₅₀ para ésteres de glicerina polietoxilados mediante ensayo con <i>Daphnia magna</i> -----	205
Figura V.56.-Linealización entre el % de Efecto y la concentración del tensioactivo -----	206
Figura V.57.-Linealización entre el % Inhibición y la concentración del tensioactivo-----	206
Figura V.58.-Datos de EC ₅₀ e IC ₅₀ para LAS-----	207
Figura V.59.- Datos de toxicidad para los tensioactivos ensayados -----	208
VII.- CONCLUSIONES-----	213
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	221

