

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE  
TENSIOACTIVOS COMERCIALES:  
BIODEGRADABILIDAD, TOXICIDAD Y  
OZONIZACIÓN

**TESIS DOCTORAL**

**Programa de Doctorado en Química**

FRANCISCO RÍOS RUIZ

2014

DIRECTORES:

Dra. MERCEDES FERNÁNDEZ SERRANO

Dra. MANUELA LECHUGA VILLENA

Dr. ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Francisco Ríos Ruíz  
D.L.: GR 266-2015  
ISBN: 978-84-9083-279-0



**UNIVERSITY OF GRANADA**

DEPARTMENT OF CHEMICAL ENGINEERING



ENVIRONMENTAL IMPACT OF  
COMMERCIAL SURFACTANTS:  
BIODEGRADABILITY, TOXICITY AND  
OZONATION

**Ph.D. THESIS**

**Doctoral Program in Chemistry**

FRANCISCO RÍOS RUIZ

2014

SUPERVISORS:

Dra. MERCEDES FERNÁNDEZ SERRANO

Dra. MANUELA LECHUGA VILLENA

Dr. ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA



# **COMPORTAMIENTO AMBIENTAL DE TENSIOACTIVOS COMERCIALES: BIODEGRADABILIDAD, TOXICIDAD Y OZONIZACIÓN**

**Por:**

**FRANCISCO RÍOS RUIZ**

Memoria presentada para la obtención del grado Internacional de  
Doctor por la Universidad de Granada

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

Granada, septiembre de 2014

**Directores de la Tesis:**

**Prof. Dra. Mercedes Fernández Serrano**  
Profesora Titular del Departamento de  
Ingeniería Química

**Prof. Dra Manuela Lechuga Villena**  
Profesora Contratada Doctora del  
Departamento de Ingeniería Química

**Prof. Dr. Alejandro Fernández Arteaga**  
Profesor Contratado Doctor del  
Departamento de Ingeniería Química



El doctorando FRANCISCO RÍOS RUIZ y los directores de la Tesis MERCEDES FERNÁNDEZ SERRANO, MANUELA LECHUGA VILLENA y ALEJANDRO FERNÁNDEZ ARTEAGA, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Granada, a 11 de septiembre de 2014

El Doctorando:

**Fdo.: Francisco Ríos Ruiz**

Los Directores de la Tesis:

**Fdo.: Mercedes Fernández Serrano**  
Profesora Titular del Departamento de  
Ingeniería Química

**Fdo.: Manuela Lechuga Villena**  
Profesora Contratada Doctora del  
Departamento de Ingeniería Química

**Fdo.: Alejandro Fernández Arteaga**  
Profesor Contratado Doctor del  
Departamento de Ingeniería Química





*A los que están,  
a los que ya no están  
y a los que vendrán.*



# Agradecimientos

En esta memoria se recoge el trabajo realizado en los últimos años en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada, trabajando con los grupos de investigación TEP-212 y RNM-332.

Durante este periodo es mucha la gente que ha jugado un papel importante en el desarrollo de esta tesis tanto en el campo profesional como en el personal. Es por ello que me gustaría mostrarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar a mis directores de Tesis, a la Dra. Mercedes Fernández Serrano, a la Dra. Manuela Lechuga Villena y al Dr. Alejandro Fernández Arteaga, por la confianza que han depositado en mí y por guiarme durante estos años de trabajo. También me gustaría agradecer a la Dra. Encarnación Jurado Alameda, directora del grupo de investigación.

Al profesor Stanisław Ledakowicz, a Marta Gmurek y Magda Olak del Departamento de Ingeniería de Bioprocesos de la Universidad Técnica de Łódź, Polonia, por dedicar su tiempo y paciencia a enseñarme durante mi estancia en su laboratorio, y por facilitarme en todo lo posible los tres meses que pasé en Polonia.

Al Ministerio de Educación por la concesión de la Beca para Formación de Profesorado Universitario (FPU) que me ha permitido dedicarme a este trabajo.

Quisiera agradecer también a todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química, y todas las personas que han pasado por él. Especialmente a todos mis compañeros del laboratorio de tensioactivos, pues tener a buena gente alrededor hace que este trabajo sea aún más agradable.

A mis amigos más cercanos, pues son muchos los años que nos unen, y durante todo este tiempo habéis vivido todo el proceso que me ha llevado hasta aquí. Es un placer contar con vuestra amistad.

Por último y más importante, a toda mi familia, por su apoyo incondicional y porque son los que han hecho que todo sea posible.



# Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
1.1 TENSIOACTIVOS .....	27
1.1.1 Clasificación de Tensioactivos .....	28
1.2 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS TENSIOACTIVOS .....	31
1.3 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE TENSIOACTIVOS .....	35
1.4 IMPLICACIONES AMBIENTALES.....	36
1.4.1 Introducción.....	36
1.4.2 Normativa sobre Tensioactivos y Medio Ambiente .....	38
1.4.3 Biodegradabilidad en el Medio Acuático.....	42
1.4.4 Toxicidad .....	52
1.5 ELIMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS MEDIANTE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS (AOPs). .....	57
1.5.1 Tratamiento con Ozono .....	59
1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
<b>CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS</b> .....	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3.- DETALLES EXPERIMENTALES</b> .....	<b>81</b>
3.1 TENSIOACTIVOS UTILIZADOS .....	81
3.2 DETERMINACIÓN DE LA CMC MEDIANTE MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL ...	83
3.3 MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD .....	85
3.3.1 Ensayo Estático .....	85
3.3.2 Ensayo Dinámico.....	89
3.3.3 Ensayo por el Método Respirométrico .....	93
3.3.4 Ensayo de Biodegradación con <i>Pseudomonas Putida</i> .....	96
3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	99
3.4.1 Análisis de Tensioactivos .....	99

---

3.4.2 Recuento de la Biomasa.....	106
3.4.3 Parámetros de Control.....	108
3.5 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD.....	112
3.5.1 Ensayo Toxicidad Lumistox®.....	112
3.5.2 Ecotoxicidad <i>Daphnia Magna</i> .....	115
3.5.3 Ecotoxicidad Microalgas <i>Selenastrum Capricornutum</i> .....	118
3.6 ENSAYOS CON OXIDACIÓN AVANZADA DE TENSIOACTIVOS.....	122
3.6.1 Tratamiento con Ozono .....	122
3.7 PROTOCOLO DE LIMPIEZA.....	124
3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	125
<b>CAPÍTULO 4.- RESUMEN DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO 5.- TRABAJOS PULICADOS .....</b>	<b>131</b>
5.1-. BLOQUE I: BIODEGRADACIÓN DE TENSIOACTIVOS.....	133
5.1.1 Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylnpolyglucosides in aerobic biodegradation test.....	135
5.1.2 Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants.....	151
5.1.3 Aerobic biodegradation of surfactants .....	161
5.2-. BLOQUE II: TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS .....	181
5.2.1 Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO® .....	179
5.2.2 Acute toxicity of alkylnpolyglucosides to <i>Vibrio fischeri</i> , <i>Daphnia magna</i> and Microalgae: a comparative study. ....	193
5.3-. BLOQUE III: OZONIZACIÓN DE TENSIOACTIVOS .....	205
5.3.1 Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants.....	203
5.3.2 Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants..	213
5.3.3 Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: Impact on aquatic toxicity .....	231
<b>CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>243</b>
6.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	243
6.2 GENERAL CONCLUSIONS.....	247
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>249</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>251</b>
<b>LISTA DE PUBLICACIONES .....</b>	<b>255</b>

# Resumen

## INTRODUCCIÓN

En la Tierra, el 70% de la superficie terrestre está cubierta por agua, siendo el 97% aguas oceánicas y mares, mientras que el 3% restante pertenece a las aguas continentales, como ríos, lagos, aguas subterráneas y glaciares. Sólo una pequeña parte, el 1% de estas aguas continentales, es de fácil acceso para ser utilizada por el ser humano, de ahí la enorme importancia de preservar sus cualidades.

Las aguas superficiales son los colectores de multitud de sustancias procedentes de la superficie o incluso de las aguas subálveas; muchas de estas materias se degradan en el propio medio acuático, pero otras son transportadas hasta la desembocadura sin experimentar modificaciones sustanciales en su descomposición. De esta forma, en definitiva, el mar, ríos, lagos y embalses se convierten en depósitos de contaminantes de naturaleza diversa.

Entre estos contaminantes se encuentran los tensioactivos, los cuales son ampliamente utilizados en multitud de aplicaciones como es el caso de detergentes, productos de cuidado personal, pinturas, industria textil, pesticidas, polímeros, productos farmacéuticos, minería, industria petrolífera, papelera, etc. Tras su uso, doméstico o industrial, los tensioactivos o los productos de su degradación pasan a las aguas superficiales directamente o después de no ser completamente degradados en las plantas de tratamiento de aguas residuales. A pesar del gran número de aplicaciones y de las numerosas ventajas que presentan tanto en el ámbito industrial como económico y sanitario, desde un punto de vista ambiental son considerados como un importante contaminante del medio acuático. Se requiere por tanto que sean lo más inocuos posible para el medio ambiente, es decir, fácilmente biodegradables y de baja toxicidad.

La degradación mediante actividad microbiológica es la primera transformación que sufren los tensioactivos en el medio ambiente. Además, suponen uno de los procesos más



importantes en el tratamiento de los tensioactivos en las plantas de depuración de aguas residuales. La mayoría de los tensioactivos pueden ser degradados por los microorganismos en el medio ambiente, pero no todos los tensioactivos son igual de biodegradables, incluso algunos de ellos pueden persistir bajo condiciones anaeróbicas. Por tanto, es necesario establecer las características estructurales que implican la susceptibilidad de dichas moléculas para ser degradadas. Además la biodegradabilidad de una sustancia supone uno de los criterios más importantes en la evaluación del impacto ambiental y uno de los factores más importantes para predecir su comportamiento en el medio ambiente, lo que pone de manifiesto la importancia de conocer y evaluar la biodegradabilidad de los tensioactivos.

El impacto ambiental de los productos químicos está también determinado por su ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en el caso de los tensioactivos como resultado de su actividad superficial y su acción perjudicial sobre las membranas celulares. Por consiguiente, es necesario establecer los límites permitidos para los distintos tensioactivos, evaluar el impacto sobre las comunidades de los ambientes que las reciben, comparar la sensibilidad de varias especies a los distintos tensioactivos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico, y establecer las relaciones entre la toxicidad y los parámetros estructurales de la molécula.

Con el estudio sobre la biodegradabilidad y toxicidad de los tensioactivos se dispone de información suficiente para determinar cuáles son más adecuados para formar parte de las formulaciones detergentes desde el punto de vista medio ambiental.

Por otra parte, los tensioactivos cuando llegan a las plantas de tratamiento de aguas residuales a altas concentraciones pueden inhibir el rendimiento y ser tóxicos para la biota responsable de la eliminación de los contaminantes. El tratamiento de los efluentes basado en procesos biológicos es más económico respecto a otros tratamientos con procesos oxidativos avanzados. Por esta razón surge la necesidad de combinar procesos químicos y procesos biológicos para un adecuado tratamiento de los efluentes. Entre las tecnologías más prometedoras se encuentran los Procesos de Oxidación Avanzados (AOPs), que suponen una excelente opción para la eliminación y/o modificación de compuestos recalcitrantes en constituyentes más biodegradables, oxidando parcialmente estos compuestos y propiciando un mejor tratamiento biológico posterior. El tratamiento con ozono constituye uno de los AOPs más utilizados, y puede ser empleado para transformar los tensioactivos en productos más biodegradables y menos tóxicos para los cultivos microbiológicos de reactores de biodegradación. Sin embargo, en algunos casos los productos de ozonización de los tensioactivos pueden ser incluso más tóxicos que los compuestos sin ozonizar. Por consiguiente, es de vital importancia el estudio de la relación existente entre la estructura del tensioactivo y la evolución de su biodegradabilidad y toxicidad tras el proceso de ozonización de disoluciones de tensioactivos.

En el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral se lleva a cabo una revisión general de los aspectos fundamentales anteriormente mencionados. 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. Se presentan también los aspectos más relevantes relacionados con el estudio de la biodegradabilidad y toxicidad de los tensioactivos, y el efecto sobre dichas propiedades cuando se utilizan procesos de oxidación avanzada con ozono para su eliminación.

## OBJETIVOS

Debido a las implicaciones ambientales derivadas de la presencia de los tensioactivos en los sistemas acuáticos y los problemas que conllevan su eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales, en esta Tesis se plantean unos objetivos generales que son: el estudio del comportamiento ambiental de los tensioactivos en los sistemas acuáticos, el estudio de los procesos de ozonización en la eliminación de tensioactivos, y cómo dichos procesos afectan a su biodegradabilidad y toxicidad. Para el cumplimiento de estos objetivos generales se plantean una serie de objetivos concretos que se recogen en el Capítulo II.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Capítulo III se describen los tensioactivos estudiados y sus principales propiedades, así como la metodología utilizada durante el desarrollo del trabajo experimental.

Los tensioactivos aniónicos utilizados han sido el lineal alquilbenceno sulfonato (LAS) y tensioactivos derivados de ácidos éter carboxílicos (EC); los tensioactivos no iónicos empleados han sido el nonilfenol polietoxilado (NPOE), alcoholes grasos etoxilados (FAE), alquilpoliglucósidos (APG) y óxidos de amina (AO).

La concentración micelar crítica (CMC) para estos tensioactivos se ha determinado a través de medidas de tensión superficial utilizando un tensiómetro de placa.

La biodegradabilidad se ha evaluado utilizando distintos métodos de ensayo: ensayo de biodegradación estático y dinámico, ensayo de biodegradación por el método respirométrico y ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida*. Para el seguimiento de la biodegradación se han empleado diferentes técnicas en función del ensayo empleado y el tensioactivo estudiado, dichas técnicas son: método simplificado para el análisis de las sustancias activas al azul de metileno, método del yodo-yoduro, método de la antrona, medidas del carbono orgánico total (TOC), cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y recuento de la biomasa.

La toxicidad de los tensioactivos se ha analizado utilizando tres ensayos con tres organismos diferentes: ensayo LumiStox® 300 de inhibición de la intensidad luminosa de bacterias *Vibrio fischeri*, ensayo de inmovilización de microcrustáceos *Daphnia magna*, y el ensayo de inhibición del crecimiento para microalgas *Selenastrum capricornutum*.

El proceso de ozonización se ha realizado en una instalación en la que se hace burbujear una corriente de ozono y oxígeno en el recipiente adecuado que contiene la disolución de tensioactivo. El seguimiento de la degradación del tensioactivo se realiza utilizando el método simplificado para el análisis de las sustancias activas al azul de metileno, el método de la antrona, y/o medidas del carbono orgánico total (TOC), en función del tensioactivo ozonizado. La biodegradabilidad y toxicidad de las soluciones de tensioactivo ozonizadas se determina utilizando el ensayo estático de biodegradación, ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida*, y el ensayo de toxicidad con bacterias *Vibrio fischeri*.

## TRABAJOS PUBLICADOS

En los Capítulos IV y V se presentan, divididos en tres bloques temáticos, los resultados obtenidos en 8 trabajos de investigación publicados en revistas científicas de impacto.

## A.- Biodegradación de tensioactivos:

**1.- Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation test.** En este estudio se examina la biodegradación primaria y última de un tensioactivo no iónico del tipo alquilpoliglucósido, mediante ensayos de biodegradabilidad fácil. La concentración se analizó utilizando el método de la antrona, mientras que la biodegradación última fue analizada mediante medidas del carbono orgánico total. También se determinó la influencia de la concentración sobre la biodegradación primaria y última, así como la cinética de degradación. La biodegradación primaria y última se estudiaron a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo: 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L. El incremento de la concentración del compuesto de 15 a 100 mg/L conlleva una disminución en la velocidad relativa máxima de mineralización y mayores tiempos de latencia, con un factor de aumento de aproximadamente 4.3. Durante el proceso de degradación se observan dos etapas, las cuales están bien descritas por Quiroga y modelos cinéticos de primer orden, respectivamente. Para el estudio de la influencia de la concentración se evaluaron los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación en los diferentes ensayos.

**2.- Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants.** En este trabajo se ha investigado la biodegradación última y la toxicidad de tres tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos con diferente cadena alquílica y grado de etoxilación. La biodegradación aerobia última se siguió mediante medidas de carbono orgánico disuelto a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo. Con objeto de comparar los tensioactivos, se determinaron los parámetros característicos del proceso de biodegradación, como tiempo de vida medio, velocidad media de biodegradación y concentración residual de tensioactivo. El aumento de la concentración inicial de tensioactivo provoca la disminución de la mineralización y prolonga el tiempo de vida medio. Los resultados demuestran que la biodegradación aerobia última es mayor para los tensioactivos con cadena alquílica más corta y de mayor grado de etoxilación. Los valores de toxicidad de los tensioactivos, y de sus mezcla binarias, fueron determinados usando tres organismos de prueba, los crustáceos de agua dulce, *Daphnia magna*, las bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* y las microalgas *Selenastrum capricornutum*. La toxicidad es menor para los tensioactivos de cadena alquílica más corta y mayor grado de etoxilación. También se midió la toxicidad de mezclas binarias de los tres derivados de ácidos alquil éter carboxílicos en proporción 1:1 en peso. La mezcla menos tóxica resultó ser la formada por los tensioactivos que presentan menor toxicidad individual.

**3.- Aerobic biodegradation of surfactant.** En este trabajo se estudia de forma general la biodegradación de varias familias de tensioactivos utilizando los ensayos de biodegradación estático, dinámico, de respirometría y con bacterias *Pseudomonas putida*. Del análisis efectuado se obtiene que los resultados de biodegradabilidad dependen del ensayo usado, así como de la familia de tensioactivo. Se ha evidenciado también la influencia de la concentración y de la estructura del tensioactivo en la biodegradabilidad. Todos los tensioactivos analizados pueden considerarse biodegradables a bajas concentraciones. Los alcoholes grasos etoxilados y especialmente el FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> son los más biodegradables mientras que los derivados de éteres carboxílicos son los menos.

## B.- Toxicidad de tensioactivos

**4.- Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®.** En este trabajo se han determinado los valores de toxicidad para tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de nombre comercial AKYPO® y para el tensioactivo aniónico lineal alquilbenceno sulfonato (LAS). Para ello se emplearon el ensayo de inmovilización con *Daphnia magna* (microcrustáceos de agua dulce), el ensayo LumiStox® 300 en el que se emplean bacterias

luminiscentes *Vibrio fischeri*, y el ensayo de inhibición del crecimiento para microalgas *Selenastrum capricornutum*. Se han estudiado tres derivados de ácidos alquil éter carboxílicos con diferente cadena alquímica y grado de etoxilación (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>) y el LAS-R<sub>11-14</sub>. Para todos los ensayos, los resultados indican que *V. fischeri* es más sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos estudiados que *D. magna* y *S. capricornutum*. Los resultados demuestran que la toxicidad es más baja para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos con la cadena alquímica más corta y que el tensioactivo aniónico LAS presenta valores de toxicidad intermedios.

**5.- Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study.** En este artículo se han determinado los valores de toxicidad para alquilpoliglucósidos aplicando el ensayo de inmovilización de *Daphnia magna*, el ensayo con bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* LumiStox® 300 y el ensayo con microalgas *Selenastrum capricornutum*. Se han estudiado tres alquilpoliglucósidos con diferente longitud de cadena y grado de polimerización. Para todos los ensayos, los resultados indican que la bacteria *V. fischeri* fue más sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos que *D. magna* y *S. capricornutum*. Los resultados demuestran que, independientemente de la especie ensayada, existe una considerable variación de la toxicidad con la estructura para los tensioactivos a base de glucosa. La toxicidad aumenta al disminuir la concentración micelar crítica del tensioactivo, y cuando la longitud de cadena alquímica y por tanto su carácter hidrofóbico aumentan.

### **C.- Ozonización de tensioactivos**

**6.- Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants.** En este estudio se ha investigado la influencia de la ozonización en soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos utilizados fueron óxidos de amina, los cuales constituyen una clase particular de tensioactivos no iónicos ya que presentan comportamiento catiónico en soluciones ácidas. Presentan buenas propiedades espumantes y son compatibles con la piel. El proceso de ozonización se llevó a cabo a 25 °C en un reactor agitado durante 30 min, donde se burbujaba el ozono gaseoso. El grado de mineralización alcanzado después del proceso de ozonización se evaluó mediante medidas del carbono orgánico total antes y después de la ozonización. La influencia de la ozonización en la biodegradabilidad de las soluciones de tensioactivo fue estudiada mediante el ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida*. La eficiencia de biodegradación de los óxidos de amina ozonizados también se investigó. Los resultados muestran que la efectividad de la ozonización depende de la estructura química de la molécula de tensioactivo y que el proceso de ozonización solo mejora ligeramente la biodegradación de estos tensioactivos.

**7.- Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants.** En este estudio se investiga la biodegradación primaria y final de tensioactivos aniónicos y no iónicos para evaluar el uso combinado de la ozonización y biodegradación en la eliminación de tensioactivos. Los tensioactivos usados fueron alquilpoliglucósidos y lineal alquilbenceno sulfonato. El tensioactivo aniónico, que contiene un anillo de benceno en su estructura, fue oxidado más rápido que el tensioactivo no iónico. Ambos tensioactivos mostraron una mineralización pobre debido a la ozonización indicando que el ozono ataca principalmente los enlaces de carbono. Los resultados indican que la eliminación de tensioactivos y del carbono orgánico total se incrementa por el uso consecutivo de ozonización y biodegradación.

**8.- Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: impact on aquatic toxicity.** En este trabajo se lleva a cabo el estudio de la influencia de la ozonización en la toxicidad acuática de tensioactivos comerciales aniónicos y no iónicos. Los valores de toxicidad se determinaron usando bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*. Se realizaron medidas de tensión superficial para estudiar la actividad interfacial. El comportamiento de los tensioactivos frente a la ozonización depende de la estructura química. Se encontró que algunos productos intermedios de la ozonización son más tóxicos que el tensioactivo base, mientras que otros resultaron ser menos tóxicos. Los tensioactivos con anillos aromáticos como el lineal alquilbenceno sulfonato, o tensioactivos con grupos glucosídicos como los alquilpoliglucósidos, presentan menor toxicidad después de la ozonización. Por otra parte, los grupos éter presentes en los alcoholes grasos etoxilados y en los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y los grupos derivados de ácidos carboxílicos presentes también en los éteres carboxílicos, conducen a un aumento de la toxicidad después de la ozonización. Los tensioactivos con grupos éter probablemente forman compuestos polietoxilados de cadena corta y ácidos carboxílicos, los cuales son los posibles responsables de la disminución de la tensión superficial que promueve el incremento de la toxicidad.

### CONCLUSIONES GENERALES

Por último en el Capítulo VI se exponen las principales conclusiones generales derivadas de los distintos trabajos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral.

# Summary

## INTRODUCTION

On Earth, 70% of the Earth's surface is covered by water. The 97% is oceanic waters and seas, while the remaining 3% belongs to inland waters, such as rivers, lakes, groundwater and glaciers. Only a small fraction, 1% of these inland waters, is easily accessible to be used by humans, hence the enormous importance of preserving its qualities.

Surface waters are the collectors of a multitude of substances from the surface or even the subsurface waters; many of these substances are degraded in the own aquatic environment, but others are transported to the river mouth without experiencing substantial changes in its decomposition. Thus, ultimately, the sea, rivers, lakes and dams become reservoirs of pollutants of diverse nature.

These pollutants include surfactants, which are widely used in many applications such as detergents, personal-care products, paints, textiles, pesticides, polymers, pharmaceuticals, mining, oil recovery, and the pulp and paper industries. After domestic or industrial use, surfactants and their degradation products go directly to the surface water or after not being completely degraded in the wastewater treatment plants. Despite the large number of applications and the many advantages that present in the industrial, economic and health field, from an environmental point of view, they are considered as an important pollutant of the aquatic environment. Therefore, it is required to be as safe as possible to the environment, i.e., readily biodegradable and low toxicity.

Degradation of surfactants through microbial activity is the primary transformation occurring in the environment and an important process to treat surfactants in raw waste in sewage-treatment plants. Most surfactants can be degraded by microbes in the environment, although some surfactants may be persistent under anaerobic conditions. Therefore, it is necessary to establish the structural characteristics that govern the susceptibility of these molecules to be degraded.

In addition, the biodegradability of a substance represents one of the most important criteria in the evaluation of the environmental impact, and it is an important factor to predict its behavior in the environment.

The environmental impact of the chemicals is also determined by its ecotoxicity, which is relatively high in the case of surfactants as a result of its surface activity and their damaging effect on cell membranes. Thus it is necessary: to establish the limits for the surfactants, to assess the impact on the communities that receive the pollutant, to compare the sensitivity to different species for the same toxic, and to establish the relationships between toxicity and the structural parameters.

Study of biodegradability and toxicity of surfactants provides enough information to determine which are most suitable to be part of the detergent formulations from an environmental view point.

On the other hand, the discharge of surfactants into the wastewater treatment plant at high concentrations, can inhibit the efficiency and be toxic to the biota responsible for removing the pollutants. Treatment of effluents based on biological processes is more economical compared to other advanced oxidation processes. For this reason, the need to combine chemical processes and biological processes arises. Advanced Oxidation Processes (AOPs) are an excellent option for the removal and/or degradation of recalcitrant compounds into more biodegradable constituents. Treatment with ozone is one of the most used AOPs. It can be used to transform the surfactant into more biodegradable and less toxic products for microbiological cultures of the biodegradation reactors. However, in some cases, ozonation products may be even more toxic than the compounds without ozonated. Therefore, it is essential to study the influence of the ozonation processes on the biodegradability and toxicity of surfactant solutions.

Chapter I shows a general review of the fundamental aspects mentioned previously, which include: the most important physical and chemical properties of surfactants, major adverse effects on the environment, prevailing legislation, the most relevant aspects of the study of the biodegradability and toxicity of surfactants, and the influence of the ozonation processes on the removal of surfactants.

## **OBJECTIVES**

The main objectives proposed in this thesis are: the study of the environmental behavior of surfactant in water systems, the study of the ozonation processes in removing surfactants, and how these processes affect the biodegradability and toxicity of the surfactants. In order to achieve this main objectives, the research carried out was divided in specific goals, which are contained in Chapter II.

## **MATERIALS AND METHODS**

Chapter III describes the surfactants used and their main properties, as well as the methodology used in the experimental work.

The anionic surfactants used were the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and ether carboxylic derivative surfactants (EC); the non-ionic surfactants studied were the nonylphenol polyethoxylate (NPEO), fatty alcohol ethoxylates (FAE), alkylpolyglucosides (APG) and amine-oxides based surfactants (AO).

Critical micelle concentration (CMC) was determined for the surfactants using surface-tension measurement.

Biodegradability of surfactants was evaluated using the following test: screening test, confirmatory test, respirometry test and *Pseudomonas putida* biodegradation test. The biodegradation was monitored using analytical methods in function of the surfactant tested: methylene blue active substances method, iodine-iodide colorimetric method, anthrone method, measurement of total organic carbon (TOC), high-performance liquid chromatography (HPLC), and biomass growth.

Toxicity of surfactants was analyzed using three test with different organisms: LumiStox® 300 test with luminescent bacteria *Vibrio fischeri*, 24-h immobilization test with microcrustaceans *Daphnia magna*, and 72-h growth inhibition test with microalgae *Selenastrum capricornutum*.

The ozonation process was performed in a reactor, containing the surfactant solution, where the gaseous ozone was bubbled. The degradation was monitored by means of the residual-surfactant concentration over time using the methylene blue active substances method, anthrone method and/or by measuring the total organic carbon (TOC), in function of the surfactant ozonated. Biodegradability and toxicity of the ozonated surfactant solutions were determined using the screening test, *Pseudomonas putida* biodegradation test or toxicity test with bacteria *Vibrio fischeri*.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results, grouped in eight published research and divided into three blocks, are presented in Chapter IV and V:

### A.- Biodegradation of surfactants

**1.- Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation test.** This study examines the primary and ultimate biodegradation of a non-ionic surfactants, an alkylpolyglucoside, in ready biodegradability tests. The surfactant concentration was tested by the anthrone method, while the ultimate biodegradation (mineralization) was analyzed by the total organic carbon determinations. The influence of the concentration on the extent of primary and ultimate biodegradation and the kinetics of degradation also were determined. The primary and ultimate biodegradation was studied at different initial concentrations: 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L. The increasing concentration of test chemical from 15 to 100 mg/L resulted in a decrease in the relative maximum mineralization rate and longer estimated lag times by a factor of approximately 4.3. During the degradative process, two different stages were noted; these are better described with Quiroga and first-order kinetic models, respectively. For the study of the influence of concentration, the parameters characteristics of the biodegradation profiles in the different biodegradation assays were evaluated.

**2.- Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants.** The ultimate aerobic biodegradability and toxicity of three ether carboxylic derivative surfactants having different alky chains and degrees of ethoxylation were investigated. Ultimate aerobic biodegradability was screened by means of dissolved organic carbon determinations at different initial surfactant concentrations. For comparison, the characteristics parameters of the biodegradation process, such as half-life, mean biodegradation rate, and residual surfactant concentration, were determined. Increased surfactant concentrations decreased mineralization and lengthened the estimated half-life. The results demonstrate that the ultimate aerobic biodegradability is higher for the surfactants with the shortest alkyl chain and highest degree of ethoxylation. Toxicity values of the surfactant, and their binary mixtures, were determined using three test organisms, the freshwater crustacean *Daphnia magna*, the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* and the microalgae *Selenastrum*



*capricornutum*. The toxicity is lower for the surfactants with the shortest alkyl chain and highest degree of ethoxylation. The toxicity of binary mixtures of the three ether carboxylic surfactants at a 1:1 weight ratio was also measured. The least toxic mixture is formed by the surfactants having lower individual toxicity.

**3.- Aerobic biodegradation of surfactant.** In this work, biodegradation of several families of surfactants was studied. The test used were: screening test, confirmatory test, respirometry test and the biodegradation test with *Pseudomonas putida*. According to the analysis, the biodegradation results depend on the biodegradation test used and the surfactant structure. The importance of the influence of the initial concentration has been evidenced. All the surfactant tested can be considered as biodegradable at low concentrations. Fatty-alcohol ethoxylates and especially the FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> are the most biodegradable, but the alkyl ether carboxylic acid derivative surfactants are the least biodegradable.

### **B.- Toxicity of surfactants**

**4.- Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®.** In this paper, toxicity values of ether carboxylic derivatives surfactants with commercial name AKYPO®, and the anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS), have been determined by applying the 24-h immobilization test with *Daphnia magna* (freshwater crustacea), the LumiStox® 300 test which employs the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* of the strain *Vibrio fischeri*, and the 72-h algal growth-inhibition test with the microalgae *Selenastrum capricornutum*, using culture-growth inhibition as the effect criterion. Three ether carboxylic derivatives surfactants with different alkyl chain and degree of ethoxylation (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>), and LAS have been tested. For all tests, the results indicated that *Vibrio fischeri* is more sensitive to toxic effects from ether carboxylic derivatives surfactants and LAS than *Daphnia magna* or *Selenastrum capricornutum*. The results demonstrate that the toxicity is lower for the ether carboxylic derivatives surfactants with the shortest alkyl chain. The anionic surfactant LAS presents intermediate toxicity values.

**5.- Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: a comparative study.** In this work, toxicity values of alkylpolyglucosides have been determined by applying the 24-h immobilization test with *Daphnia magna*, the LumiStox 300 test which employs the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* and the test with *Selenastrum capricornutum*. Three alkylpolyglucosides with different alkyl chain and degree of polymerisation have been tested. For all tests, the results indicated that *V. fischeri* was more sensitive to toxic effects from alkylpolyglucosides than was *D. magna* or *S. capricornutum*. The results demonstrate considerable variation in toxicity responses within structurally related glucose-based surfactants regardless of the species tested. The toxicity increased as the critical micelle concentration decreased, and as the alkyl chain length and resultant hydrophobicity increased.

### **C.- Ozonization of surfactants**

**6.- Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants.** The influence of ozonation of aqueous solutions of non-ionic surfactants was investigated in this study. The research was conducted using solutions of amine oxide based surfactants. These surfactants constitute a particular class of non-ionic surfactants that exhibit cationic behaviour in acid solution, they show good foaming properties and are skin compatible. The ozonation process was carried out at 25°C in a stirred tank reactor for 30 min, where gaseous ozone was bubbled. The degree of mineralization achieved after the ozonation process was evaluated by measuring the total organic carbon before and after ozonation.

The influence of ozonation on biodegradability of the solutions was studied using the biodegradation test by *Pseudomonas putida*. Biodegradation efficiency of the ozonated amine oxides based surfactants was also evaluated. It was found that the effectiveness of ozonation depended on the chemical structure of surfactant molecule. Ozonation only slightly improved biodegradation of these surfactants.

**7.- Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants.** This study investigated the extent of primary and final biodegradation of anionic and non-ionic surfactants to evaluate the combined use of ozonation and biodegradation in surfactant removal. The surfactants used were alkylpolyglucosides and linear alkyl benzene sulfonates. The anionic surfactant containing a benzene ring on its structure was oxidized faster than was the non-ionic surfactant. Both surfactants showed poor mineralization due to ozonation indicating an ozone attack primarily on carbon bonds. The results indicate that the removal of surfactants and of the total organic carbon is increased by the consecutive use of ozonation and biodegradation.

**8.- Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: impact on aquatic toxicity.** The objective of this study was to investigate the influence of ozonation of anionic and non-ionic surfactants on their aquatic toxicity. Toxicity values of various commercially important anionic and non-ionic surfactants have been determined using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Surface tension measurements were made to study the interfacial activity. The behavior depends on the chemical structure. Some intermediate ozonation products were found to be more toxic than the base surfactant and others were found to be less. Surfactants with aromatic rings such as linear alkyl benzene sulfonates, or surfactants with glycosidic groups such as alkylpolyglucosides, exhibit a lower toxicity after ozonation. On the other hand, ether groups present in the fatty-alcohol ethoxylates and ether carboxylic derivative surfactants, and carboxylic acid derivatives present in the ether carboxylic derivative surfactants lead to increasing toxicity after ozonation. Surfactants with ether groups probably formed short-chain polyethoxylated compounds and carboxylic acids, which are possibly responsible for the surface-tension decrease that promotes the toxicity increase.

## GENERAL CONCLUSIONS

Finally, the main conclusions from the various research are presented in Chapter VI.



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 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 por poseer propiedades 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).

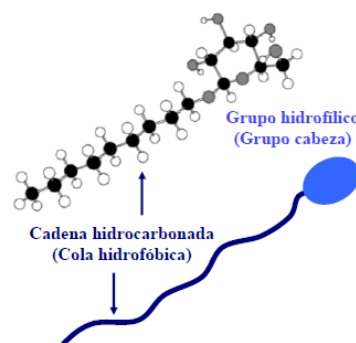


Figura I.1.- Estructura básica de un tensioactivo

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 o de absorción en la interfase agua/aire, la formación de emulsiones y/o microemulsiones, la formación de micelas, etc.

### 1.1.1 CLASIFICACIÓN DE TENSIOACTIVOS

Desde el punto de vista comercial los tensioactivos se clasifican según su aplicación. Sin embargo se observa que muchos tensioactivos son susceptibles de ser utilizados en aplicaciones diferentes, lo que provoca confusiones. Por tanto, es más adecuado clasificarlos de acuerdo a la estructura de su molécula, o más exactamente según la forma de disociación en el agua. 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. A este tipo pertenecen los detergentes sintéticos como los alquil benceno sulfonatos, los jabones (sales de sodio de ácidos grasos), los agentes espumantes como el lauril sulfato, los humectantes del tipo sulfosuccinato, los dispersantes del tipo lignosulfonatos, etc. 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. La gran mayoría de estos tensioactivos son compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario. 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 son bajas. La fabricación de estos tensioactivos es mucho más cara que la de los anteriores y es por esta razón que no se les utilizan salvo en caso de aplicaciones particulares, como cuando se hace uso de sus propiedades bactericidas o de su facilidad de adsorción sobre sustratos biológicos o inertes que poseen una carga negativa. Esta última propiedad hace que sean excelentes agentes antiestáticos, emulsionantes, hidrofobantes, así como inhibidores de corrosión, y puedan ser utilizados tanto en productos industriales como para uso doméstico. 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 tales como grupos del tipo alcohol, fenol, éter o amida, lo que los hace solubles en ésta. Una alta proporción de estos surfactantes pueden tornarse relativamente hidrofílicos gracias a la presencia de una cadena poliéter del tipo polióxido de etileno. El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad. 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 confirmando 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. Los anfóteros son en general tan caros como los catiónicos y por esta razón su utilización se reduce a aplicaciones particulares.

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

Tabla I.1.- Principales tipos de tensioactivos utilizados (Sibila, 2008)

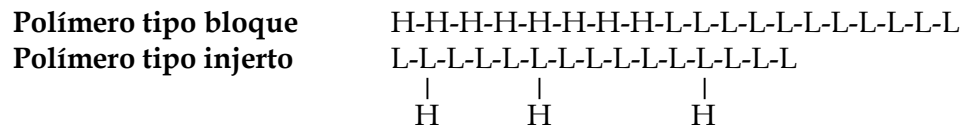
Clase	Nombre Común	Acrónimo
<b>Tensioactivos aniónicos</b>	Lineal alquilbenceno sulfonatos	LAS
	Alcanos sulfonatos secundarios	SAS
	Alcoholes éter sulfatos (alquil etoxisulfatos)	AES
	Alcoholes sulfatos (alquil sulfatos)	AS
<b>Tensioactivos no-iónicos</b>	Alquilfenoles etoxilados	APE o APEO
	Nonilfenoles etoxilados	NPE o NPEO
	Octilfenoles etoxilados	OPE u OPEO
	Alcoholes etoxilados	AE o AEO
<b>Tensioactivos catiónicos</b>	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).

Existen otros tipos de tensioactivos diferentes a los convencionales porque poseen una característica excepcional, incluso si ellos pertenecen a los a los grupos mencionados anteriormente: los tensioactivos siliconados, fluorados, de estructura polimérica y los biotensioactivos (biosurfactantes).

- **Tensioactivos siliconados:** el carácter hidrófobo de las polisiliconas es bien conocido. Si se introducen grupos de órgano silicona en una molécula de tensioactivo, se aumenta el carácter hidrófobo de éste. Como consecuencia se puede fabricar una "cola" lipofílica siliconada más corta que su equivalente hidrocarbonado. Se consiguen prácticamente todos los equivalentes siliconados reemplazando varios átomos de carbono por uno de silicio. Muchos de estos tensioactivos pueden cristalizarse en acetona y por tanto obtenerse en forma muy pura. Algunos de ellos se utilizan en farmacia como agentes antilflatulentos ya que rebajan la tensión superficial y son totalmente inertes desde el punto de vista biológico.
- **Tensioactivos fluorados:** la sustitución de átomos de hidrógeno en la cadena hidrocarbonada por átomos de fluor produce compuestos que se llaman fluorocarburos. Se conocen las propiedades extraordinarias de los fluorocarburos como el politetra fluoroetileno, más conocido como TEFLON: muy alta pasividad química, mecánica y térmica, muy baja energía por tanto muy fuerte hidrofobicidad. La introducción de hidrocarburos perfluorados en las partes lipofílicas de los tensioactivos aumenta el carácter hidrófobo y disminuye la reactividad química. Se les utiliza por ejemplo en las espumas de extintores de incendio, donde su resistencia térmica es una ventaja suplementaria.

- **Tensioactivos poliméricos:** hay dos tipos de configuración de base: el tipo bloque y el tipo injerto. En el esquema que sigue se designa por H y L los agrupamientos o eslabones hidrofílicos y lipofílicos.



En el primer caso los eslabones hidrofílicos se acoplan entre ellos para formar un grupo hidrofílico, y los eslabones lipofílicos hacen lo mismo. Se tiene por tanto un tensioactivo macromolecular pero con zonas bien definidas. El polímero bloque más conocido es el copolímero óxido de etileno - óxido de propileno. Sin embargo no se puede decir que estos grupos están completamente separados ya que existe un solo grupo metileno de diferencia entre ellos aunque uno sea hidrofílico mientras el otro sea lipofílico. Estos tensioactivos se venden como agentes humectantes y detergentes y como aditivos de deshidratación de petróleo.

La mayoría de los polímeros tensioactivos naturales son del segundo tipo, al igual que muchos de los productos de síntesis. Muchas moléculas de polielectrolitos poseen la estructura "injerto", aunque ellos no son estrictamente tensioactivos o no son utilizados como tales. De todas maneras se observa que estos polielectrolitos hidrosolubles o hidrodispersables se utilizan a menudo como aditivos por sus propiedades coloidales como agentes anti-redeposición o agentes viscosantes (carboximetil celulosa, ácido poliacrílico y sus derivados). Existe una gran variedad de polímeros tensioactivos del tipo "injerto". Para fabricarlos es suficiente producir un polímero con eslabones lipofílicos susceptibles de aceptar un grupo hidrofílico.

- **Biotensioactivos:** se tratan de moléculas biológicas (orgánicas) con propiedades surfactantes o tensioactivas producidas sobre superficies vivas, mayormente superficies de células microbianas, o excretados al medio extracelular. Son moléculas complejas que cubren un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, antibióticos, lipopéptidos, etc... Los microorganismos también producen en algunos casos, tensioactivos que son combinaciones de muchas estructuras químicas como los tensioactivos microbianos poliméricos. Muchos tensioactivos microbianos han sido purificados y sus estructuras químicas son conocidas. Mientras que los de alto peso molecular son generalmente heteropolisacáridos polianiónicos que contienen tanto polisacáridos como proteínas, los de bajo peso molecular suelen ser glicolípidos.

Los tensioactivos de origen biológico presentan en general menor toxicidad y mayor biodegradabilidad que los tensioactivos sintéticos. Entre las aplicaciones más estudiadas de los biotensioactivos están aquellas relacionadas con la industria del petróleo y la bioremediación de sitios o residuos contaminados con hidrocarburos. En los últimos años ha crecido el interés por evaluar la potencial utilidad de los biosurfactantes en las disciplinas médicas y veterinarias, dado que existen estudios que demuestran propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales e incluso antitumorales en estos compuestos. Además, los biotensioactivos también han mostrado contrarrestar la adhesión y la formación de biofilms de microorganismos patógenos.

## 1.2 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.

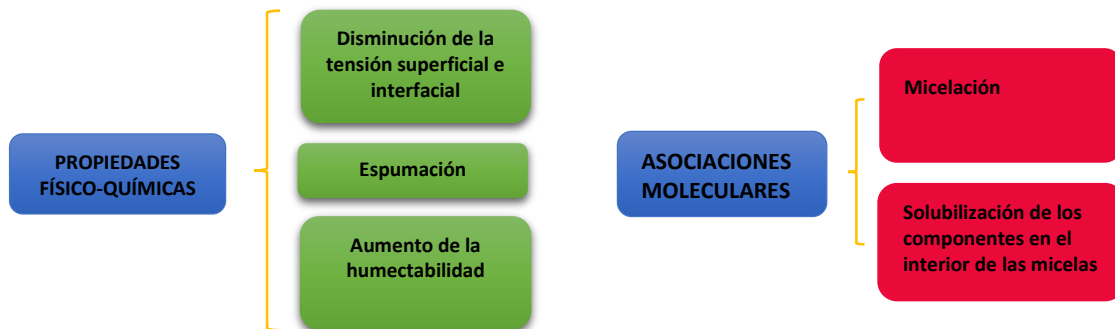


Figura I.2.- Propiedades de los tensioactivos

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

– *Formación de micelas*: en disoluciones acuosas las moléculas anfifílicas forman micelas en las que los grupos polares están en la superficie y las partes apolares quedan inmersas en el interior de la micela en una disposición que elimina los contactos desfavorables entre el agua y las zonas hidrófobas y permite la solvatación de los grupos de las cadenas polares. En otro tipo de medios, las moléculas anfifílicas se pueden organizar como micelas inversas. Cuando se tiene una baja concentración de tensioactivo, las moléculas están presentes como monómeros. A mayores concentraciones, la energía libre del sistema puede ser reducida mediante la agregación de moléculas en micelas con la parte hidrófoba localizada en el centro y la cabeza hidrófila hacia el solvente. La concentración a la que esto ocurre es conocida como “Concentración Micelar Crítica” (CMC). Figura I.3. El valor de la CMC depende del tipo de molécula, concretamente de su relación hidrófila/hidrófoba (y así moléculas con regiones hidrófobas largas tienen valores de CMC más bajos), fuerza iónica (los tensioactivos no iónicos tienen menor CMC que los aniónicos y catiónicos (Ying, 2006)), y de la temperatura. Es la formación de micelas en solución la que le confiere al tensioactivo sus propiedades de solubilización y detergencia.

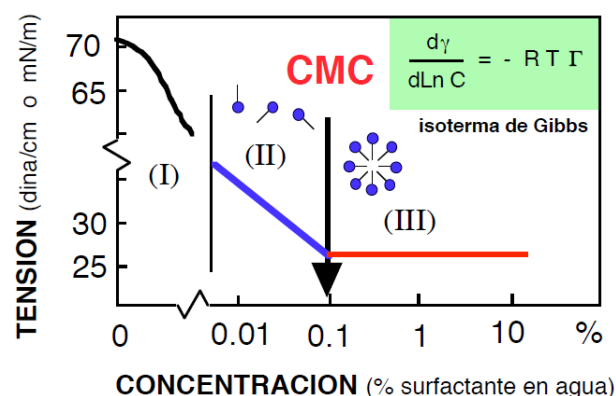


Figura I.3.- Modificación de la tensión superficial en función de la concentración de tensioactivo y formación de micelas

– *Solubilización*: para concentraciones superiores a la CMC, el tensioactivo tiene la capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos, llegando a solubilizarse 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).

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

La detergencia es (al menos en cuanto a tonelaje) junto a la cosmética, la aplicación principal de los tensioactivos (Deleu, 2004), estos dos campos suponen más del 60 % de las necesidades. La perfumería se relaciona como rama auxiliar de estos y en menor proporción, el mercado de los alimentos y el de los fármacos.

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

Tipo de Industria	Tensioactivos	Campos de Aplicación
ALIMENTARIA	Acilgliceroles Esteres de sorbitano Copolímeros de óxido de etileno-propileno, Alquilsulfatos, Ésteres de poliglicol	Emulsionantes Humectantes Antiespumantes Limpieza de instalaciones
CURTIDOS	Nonilfenoles polietoxilados Alcoholes grasos polietoxilados Monoésteres de ácidos grasos sulfatados Alquilsulfatos Alquilnaftalensulfonatos, Lignin-sulfonatos, Aceites saturados	Humectación/penetración Desengrase Curtición Tintura Engrase Pastas de pigmento
PINTURAS, LACAS Y TINTES	Condensados de naftalensulfonato y formaldehído Alquilsulfato, Dialquilsulfosuccinato sódico, Alcoholes grasos polietoxilados, Aminas polietoxiladas	Dispersión de pigmentos Modificadores de fluidez Emulsionantes de resinas
AGRICULTURA	Alquilbenceno sulfonatos Nonilfenoles polietoxilados, Esteres fosfatados, Poliglicoles, Aceites sulfatados	Emulsificación de plaguicidas y herbicidas Humectación y dispersión Emulsiones oleosas

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

Tipo de Industria	Tensioactivos	Campos de Aplicación
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-silfonatos Parafin-sulfonatos Sulfatos de alcoholes grasos polietoxilados Alquil polietier 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 Imidazolin, 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 grasos 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

Según la [Norma UNE-EN ISO 862:1996](#) sobre Agentes de Superficie. Vocabulario, (UNE-EN ISO 862:1996), “Un detergente es un producto especialmente formulado para la limpieza mediante un proceso que desarrolle fenómenos de detergencia”, entendido por detergencia al proceso por el cual las suciedades son separadas del sustrato en que estaban retenidas y puestas en estado de disolución o dispersión. Un detergente está formado por uno o varios tensioactivos, que constituyen la materia activa, y por un conjunto de componentes complementarios (álcalis, secuestrates de iones, dispersantes, oxidantes, blanqueantes, colorantes, perfumes, auxiliares de presentación, etc. (Méndez, 2008).

Una 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 I.3 muestra composiciones orientativas de algunos ejemplos de formulaciones detergentes.

Tabla I.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
Limpia hogares	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

### 1.3 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE TENSIOACTIVOS

La producción mundial de tensioactivos alcanzó unos 13 millones de toneladas por año en 2008 (Rust, 2008; Levinson, 2009), se previó un crecimiento anual del 2.8 % hasta 2012 y entre 3.5 - 4 % en adelante (Resnik, 2010; Torres, 2012). En 2012 el mercado mundial de tensioactivos generó 27.040 millones de \$, siendo la área de mayor consumo Europa (31 % del total), seguido de Norteamérica (28%) y China (17%) (IHS, 2013). Para 2017 se espera que crezca hasta 36.518 millones \$ con una tasa anual de crecimiento del 6.19%, y que la región Asia-Pacífico pase a ocupar la segunda posición relegando a Norteamérica a la tercera (Markets and Markets, 2013). La Figura I.4 muestra el consumo de tensioactivos por regiones en 2012. 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).

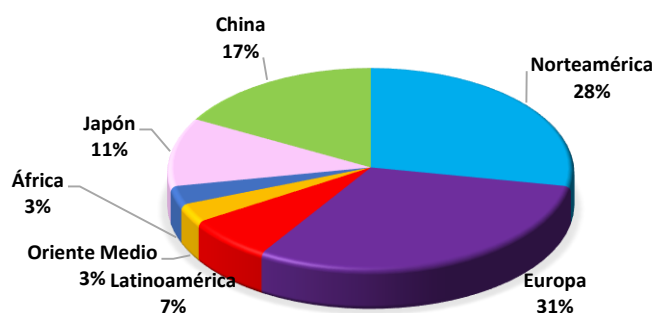


Figura I.4.- Consumo de tensioactivos por regiones (IHS, 2013)

Según el tipo de tensioactivo (basado en su carga), los tensioactivos aniónicos y no iónicos son los más demandados, suponiendo un 85 % del total, y se prevé que los tensioactivos no iónicos sean los que más crezcan hasta 2018. (Ceresana, 2012). En Europa la producción de tensioactivos no iónicos fue de 1.40 millones de toneladas y de 1.22 millones para los aniónicos, mientras que para catiónicos y anfotéricos fue de 0.24 y 0.1 millones de

toneladas respectivamente. La Figura I.5 muestra la evolución de la producción de tensioactivos en Europa en el periodo 2010-2011. (CESIO, 2011)

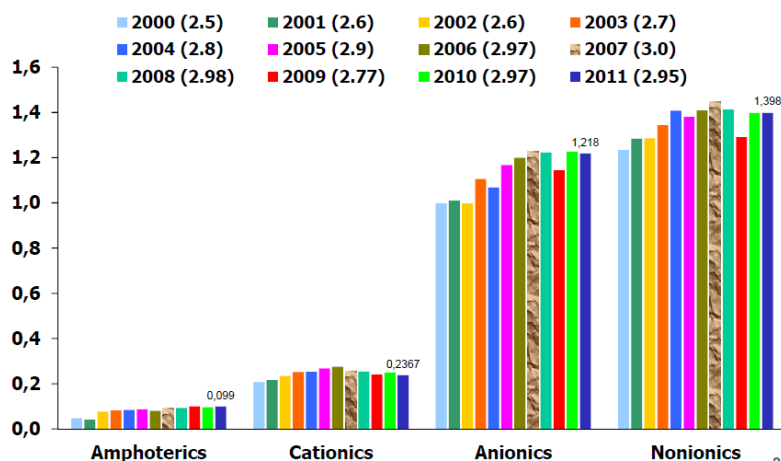


Figura I.5.- Evolución de la producción de tensioactivos en la Unión Europea\*, 2000-2011. (\*Incluye Islandia, Noruega y Suiza) (CESIO, 2011)

Según su origen, los tensioactivos sintéticos/petroquímicos seguirán siendo lo más utilizados frente a los tensioactivos de base biológica durante los próximos 5 años, sin embargo se prevé que estos últimos crezcan fuertemente hasta 2017 debido a la creciente preocupación por impacto ambiental que pueden causar, unido a la concesión de la etiqueta ecológica para los tensioactivos de origen biológico y que demuestren ser respetuosos con el medio ambiente.

La demanda total de tensioactivos en un futuro próximo dependerá de ciertos factores como el aumento de las áreas de aplicación en diversos segmentos de la industria, nuevos/alternativos productos con un precio competitivo, el aumento del consumo en países en desarrollo y el aumento de conciencia hacia los productos ecológicos.

Los tensioactivos sintéticos destacan por su disponibilidad, bajo precio y amplias áreas de aplicación, mientras que los tensioactivos de base biológica destacan por sus beneficios ecológicos, amplio rango de sustratos disponibles y el aumento de la conciencia sobre productos denominados "eco-friendly". El mercado de los tensioactivos sintéticos es un mercado moderno cuyas restricciones vienen determinadas por el variable precio del petróleo y las preocupaciones medioambientales. Por el contrario los tensioactivos de base biológica se encuentran en sus etapas iniciales de crecimiento, sus limitaciones son técnicas y económicas por su elevado precio en comparación con los sintéticos. La oportunidad para el uso de estos tensioactivos está en el aprovechamiento de residuos agrícolas e industriales y su uso en mercados no convencionales.

En cuanto a los productores de tensioactivos, el mercado está fragmentado sin un claro líder. Son pocos los grandes productores entre los que destacan: AkzoNobel N.V (Holanda), BASF SE (Alemania), P&G Chemicals (Estados Unidos), Stepan Company (Estados Unidos) y The Down Chemical Company (Estados Unidos).

## 1.4 IMPLICACIONES AMBIENTALES

### 1.4.1 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, estos son considerados como un importante contaminante del medio

acuático. Una vez utilizados en jabones y detergentes, 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 aeróbicos de biodegradación y adsorción en el material particulado, mientras que los metabolitos generados y los tensioactivos no degradados son dispersados en los diferentes compartimentos ambientales (Ying, 2006). En la Figura I.6 se observan las posibles vías de emisión de detergentes al medio ambiente. Aunque en muchos estudios se han encontrado altos porcentajes de biodegradación de tensioactivos usando procesos aeróbicos (Di Croacia, 1999) (Scott, 2000), dicha biodegradación puede inhibirse a concentraciones por encima de 50 mg/L debido a su toxicidad (Lechuga, 2013). Muchos de los tensioactivos no son biológicamente biodegradables y, dependiendo de su concentración, pueden ser muy perjudiciales para la fauna y flora de aguas superficiales.

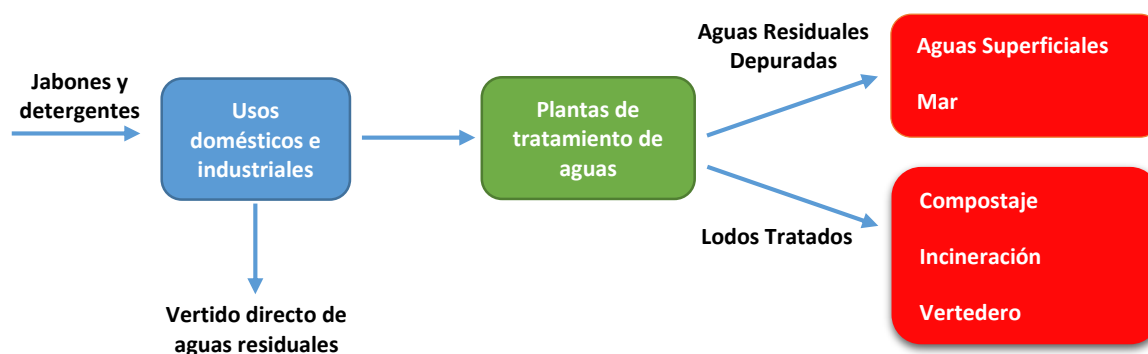


Figura I.6.- Vías de emisión de detergentes al medio ambiente

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

1. Producción de espumas tanto en ríos como en estaciones depuradoras de aguas residuales.
2. Efectos indeseables sobre la aireación, coagulación y sedimentación en estaciones depuradoras de aguas residuales.
3. Pueden ser tóxicos para los microorganismos de lodos activados o biopelículas presentes en el tratamiento secundario de las estaciones de depuración de aguas residuales.
4. Contaminación de acuíferos (no es muy frecuente y suele ser consecuencia de otro tipo de contaminación más importante).
5. Producción de efectos tóxicos adversos sobre los organismos que habitan en el medio receptor. Algunos tensioactivos provocan la inhibición del crecimiento de algas incluso a concentraciones de 1mg/L, y las dosis tóxicas en peces suelen estar en el rango de 2 a 8 mg/L (Ledakowicz, 2005).
6. Provocan la disminución de la tasa de re-oxigenación y del grado de oxigenación, que influye sobre la calidad del agua y la supervivencia de los organismos acuáticos, deteniendo la autopurificación del agua (Han, 2013).
7. Los productos de degradación de algunos tensioactivos pueden ser estrogénicos (Snyder, 2001; Snyder, 2003). Algunos estudios indicaron la presencia de peces que habitaban aguas abajo de las plantas de tratamiento de aguas residuales con importantes anomalías en la reproducción (Harries, 1996; Jobling, 1998).
8. Pueden generar residuos que al reaccionar con algunos compuestos presentes en el agua son tóxicos para el ser humano. Por ejemplo, casos de endometriosis o una disminución de la calidad del esperma pueden ser consecuencias (aunque aún sin

confirmar) asociadas a la presencia de tensioactivos en el medio ambiente (Jurado, 2013).

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 I.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 I.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

La concentración para ambos tipos de tensioactivos en las aguas depuradas es muy baja 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 I.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.

En general, las concentraciones de tensioactivos en aguas residuales pueden oscilar entre 1-20 mg/L, y en aguas superficiales en torno a 0.5 mg/L. Para uno de los tensioactivos más utilizados, lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), la concentración puede variar entre 1-18 mg/L para aguas residuales domésticas (Mungray, 2009), sobre 200 mg/L para aguas residuales industriales (Han, 2013) y entre 17-1024 mg/L en aguas residuales de lavandería (Braga, 2011). 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).

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.

#### 1.4.2 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 han promulgado normas para el control y uso de estas sustancias.

### 1.4.2.1 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 \(CE\) n° 648/2004](#) del Parlamento Europeo y del consejo de 31 de Marzo de 2004 sobre detergentes” (Reglamento CE n°648, 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 de la Comisión 89/542/CEE](#), (CEE, 1989), 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 n° 648/2004, posteriormente se le han aplicado tres actos modificativos:

- [Reglamento \(CE\) n° 1336/2008](#) (Reglamento CE n° 1336, 2008).
- [Reglamento \(CE\) n° 219/2009](#) (Reglamento CE n° 219, 2009).



- [Reglamento \(UE\) n° 259/2012](#) (Reglamento UE n° 259, 2012).

y cuatro modificaciones de los Anexos:

- Modificación del Anexo III: Métodos de ensayo de biodegradabilidad. [Reglamento \(CE\) n° 907/2006](#). (Reglamento CE n° 907, 2006).
- Modificación del Anexo VII: Etiquetado y hoja informativa de ingredientes. [Reglamento \(CE\) n° 907/2006](#). (Reglamento CE n° 907, 2006).
- Modificación del Anexo V: Lista de tensioactivos objeto de excepción. [Reglamento \(CE\) n° 551/2009](#). (Reglamento CE n° 551, 2009).
- Modificación del Anexo VI: Lista de tensioactivos de detergentes prohibidos o limitados. [Reglamento \(CE\) n° 551/2009](#). (Reglamento CE n° 551, 2009).

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:
  - Si no hay catiónicos: Método usado en la República Federal de Alemania (1989) DIN 38 409-Teil 20.
  - 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 \(CE\) N° 1272/2008](#) del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas" (Reglamento n° 1272, 2008), posteriormente modificado por el [Reglamento \(CE\) N° 790/2009](#) de la comisión de 10 de Agosto de 2009, (Reglamento n° 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.

#### 1.4.2.2 LEGISLACIÓN EN EL ÁMBITO ESTATAL

En España, la legislación: "[Orden de 5 de septiembre de 1985](#) sobre actualización de la determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos" (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, Servicios Sociales e Igualdad, en coordinación con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Ministerio de Industria, Energía y Turismo y Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.

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).

#### **1.4.2.3 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).

#### 1.4.3 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 dichos compuestos como fuente de energía (procesos catabólicos) y/ó sustrato (procesos anabólicos) (Ying, 2006). Las bacterias desarrollan constantemente nuevas rutas catabólicas de degradación para nuevos contaminantes con el fin de utilizarlos como fuentes de carbono, energía, nutrientes o simplemente para desintoxicarlos. Sin embargo, desentrañar estos procesos en la naturaleza se hace casi imposible debido al gran número de sustancias químicas y al desconocimiento sobre los productos químicos resultantes de la degradación bacteriana (Kolvenbach, 2014).

Los problemas medioambientales surgidos en la biodegradación de moléculas complejas, determinó la importancia de la distinción de diferentes tipos de biodegradabilidad, cuyo concepto está incorporado en la legislación vigente. Así, se distingue entre:

- A. Biodegradación primaria** se refiere a la que ocurre en el sustrato que permite la pérdida de las propiedades características de la molécula intacta. En el caso de los tensioactivos, está relacionada con la pérdida de su capacidad para formar espuma o con la reducción de la tensión superficial.
- B. Biodegradabilidad avanzada** se alcanza cuando la molécula de sustrato se divide en segmentos más pequeños.
- C. Biodegradación final, última o mineralización**, es la que, a través de una secuencia de ataques enzimáticos, reduce el sustrato a la estructura más simple posible. Bajo este término se engloban todos aquellos procesos realizados por agentes microbiológicos medioambientales que convierten la materia orgánica compleja en compuestos más simples que pueden ser utilizados como nutrientes y generar energía además de ser transformados en material inorgánico después de sufrir diferentes procesos químicos.

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

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

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 (estructura, solubilidad, concentración, etc.) y/ó los microorganismos presentes (tipos, concentración, etc.).

La degradación mediante actividad microbiológica es la primera transformación que sufren los tensioactivos en el medio ambiente, contribuyendo a su eliminación y por tanto reduciendo su impacto en la biota. Además, es un proceso muy importante para el tratamiento de los tensioactivos en las plantas de depuración de aguas residuales. La mayoría de los tensioactivos pueden ser degradados por los microorganismos en el medio ambiente, pero no todos los tensioactivos son igual de biodegradables, incluso algunos de ellos pueden persistir bajo condiciones anaeróbicas, (Scott, 2000). Por tanto, debido al importante impacto económico y al uso masivo de los tensioactivos es necesario establecer las características estructurales que implican la susceptibilidad de dichas moléculas para ser degradadas (Jurado, 2009). Además la biodegradabilidad de una sustancia supone uno de los criterios más importantes en la evaluación de sus riesgos ecotoxicológicos (Scott, 2000) y uno de los factores más importantes para predecir su comportamiento en el medio ambiente (Niqui-Arroyo, 2011), una rápida biodegradación bajo condiciones ambientales relevantes permitirá su uso generalizado, mientras que la ausencia de biodegradación implicará su restricción o incluso la prohibición de ser usado (Martín, 2014). Por tanto, se pone de manifiesto la importancia de conocer y evaluar la biodegradabilidad de los tensioactivos.

### 1.4.3.1 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD

#### 1.4.3.1.1 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.

Las normas UNE 55523:1990 (UNE 55523:1990) y UNE 55844:1991 (UNE 55884:1991), describen el procedimiento de ensayo de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos aniónicos y no iónicos adoptando los requisitos que establecía la OCDE.

- 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 primaria para aceptar un tensioactivo se fijó en un 80% a los 19 días del ensayo (Reglamento CE nº648, 2004), y la cantidad de inóculo debe ser tal que un tensioactivo aniónico “blando” (Marlon A), como patrón se toma lineal alquilbenceno sulfonato, 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. (UNE 55523:1990; UNE 55884:1991).

Existen otras metodologías de ensayo distintas basadas en el control de parámetros analíticos no específicos para seguir el curso de la biodegradación y que además responde a cualquier residuo o intermedio de biodegradación, indicando así la extensión de la biodegradación última del tensioactivo ensayado. Estas metodologías están recogidas en las denominadas “Guías de Ensayos” para la degradación y acumulación de compuestos tensioactivos que fueron elaboradas y recomendadas en 1981 (OCDE, 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; CEE, 1982a; CEE, 1982b)

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):** Son los llamados RBTs (Ready Biodegradability Tests). Están basados en parámetros de seguimiento de la biodegradación no específicos tales como el carbono orgánico disuelto, consumo de oxígeno o producción de CO<sub>2</sub>. 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 < 10<sup>6</sup> células/mL
- ↪ Inóculo sin pre-exposición
- ↪ Duración del ensayo inferior a 28 días: para permitir la comparación de los métodos, el grupo de expertos fijó un tiempo estándar de 28 días para la duración de los ensayos, aunque originariamente cada método tenía una duración diferente.

Si se utilizan estos ensayos puede considerarse que una sustancia es “fácilmente biodegradable” (Reglamento CE nº648, 2004):

- Cuando la disminución de la materia activa, tras el ensayo, es superior al 80%.
- Cuando la disminución de algún otro parámetro no específico es superior al 60%, como son:
  - COD (Carbono Orgánico Disuelto)
  - DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno)
  - CO<sub>2</sub>

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

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

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

En este grupo de ensayos se incluyen:

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

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

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

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

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

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

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

Además de las condiciones expuestas, otra condición arbitraria que se debe cumplir, es que la degradación del compuesto ensayado debería tener lugar dentro de los 10 días siguientes al comienzo del ensayo (14 días para el ensayo en reactor cerrado), considerando como comienzo de la degradación aquel momento en el que desaparece el 10% del sustrato adicionado. Es el llamado criterio "10 days-window" o principio de los diez días. Este criterio está siendo cuestionado por numerosos investigadores y se presenta como inadecuado para clasificar un compuesto como "fácilmente biodegradable" en especial para mezclas comerciales y compuestos de escasa solubilidad (CESIO, 2008). En la última legislación europea, ya se considera como un principio no deseable (Decisión de la comisión 383/2011, 2011). La concentración de compuesto y el inóculo es menos favorable en el ensayo estático modificado que en los otros ensayos, por lo tanto los efectos tóxicos reducen su aplicabilidad.

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

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

En la Tabla I.5 se presenta una lista de métodos para la determinación de la biodegradabilidad final.

Tabla I.5.- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad final (mineralización) de compuestos

**A. Métodos revisados de la OCDE (fácil biodegradabilidad)**

301 A COD Die-Away  
 301 B Evolución en la Producción de CO<sub>2</sub> (Test de Sturm modificado)  
 301 C Ensayo MITI<sup>c</sup> (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<sub>2</sub>)  
 C6 Ensayo en reactor cerrado (DBO)  
 C7 Ensayo MITI<sup>c</sup> (I) modificado (DBO)  
 C8 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

**C. Métodos de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO)<sup>a</sup>**

ISO 7827 Método mediante análisis de carbono orgánico disuelto  
 ISO 9408 Método mediante respirometría (demanda de oxígeno)  
 ISO 9439 Método mediante producción de CO<sub>2</sub>  
 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<sup>b</sup> 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)<sup>a</sup>**

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)<sup>a</sup>**

ISO/TC147/SC5/WG4 N140 Ensayo de simulación de lodos activos (COD)

<sup>a</sup> no se diferencia entre ensayos de fácil o inherente biodegradabilidad. <sup>b</sup> EMPA: Laboratorios Federales Suizos para el Ensayo e Investigación de Materiales. <sup>c</sup> MITI: Ministry of International Trade and Industry (Japón).

### 1.4.3.1.2 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 CO<sub>2</sub> producido por los microorganismos. Cada uno de los métodos analíticos tiene ventajas para su aplicación, pero ninguno de ellos está exento de limitaciones. Muchos de estos métodos no son aplicables a concentraciones excesivamente pequeñas (0.1-10 mg/L), concentraciones de interés en investigación ambiental y en ensayos de biodegradabilidad.



→ *Métodos físicos o no específicos:*

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

→ *Métodos químicos o semiespecíficos:*

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

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

A diferencia de los métodos físicos, los químicos distinguen entre las distintas clases de tensioactivos, aniónicos, catiónicos y no iónicos, pero dentro de cada clase no se distingue al tensioactivo concreto de que se trata, por ello se les denomina 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. Actualmente se utilizan una amplia variedad de técnicas analíticas como son: cromatografía de gases con espectrometría de masas, cromatografía líquida con detección UV (LC-UV), y con detección fluorescente (LC-FD), cromatografía de fluidos supercríticos, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear (RMN), electroforesis capilar con detección UV (CE-UV), etc.

→ *Métodos metabólicos y otros métodos no específicos:*

Algunas de estas técnicas son: DQO (Demanda Química de Oxígeno), DBO (Demanda Biológica de Oxígeno) (técnicas de botella cerrada, respirometría), COD (Carbono orgánico Disuelto), CO<sub>2</sub>, crecimiento bacteriano y toxicidad.

A continuación se describen de forma general los principales métodos de análisis para medir biodegradación primaria para tensioactivos aniónicos y no iónicos, que corresponden a los tipos 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 (OCDE, 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; Reglamento CE nº 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 colorimétrico del yodo/yoduro (Jurado, 2002).
- Método de la antrona. Se utiliza una modificación del método de la antrona propuesto por Buschmann y col. (Buschmann, 1995) para el análisis de carbohidratos y por tanto idóneo para el análisis de alquilpoliglucósidos.

#### 1.4.3.2 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.

**A. Los tipos de microorganismos** que se utilizan en los métodos de ensayo de la biodegradabilidad deben ser 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.

**B. 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.

**C. 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 estos 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.

**D. 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.

**E. Concentración inicial de tensioactivo.** Si una sustancia es utilizada por los microorganismos como sustrato, estos 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. Según Jurado y Col. (Jurado, 2007; Jurado, 2012; Jurado, 2011; Jurado, 2013), estos estudios demuestran que el proceso de biodegradación está relacionado con la concentración del tensioactivo inicial y la CMC del tensioactivo. La concentración del tensioactivo puede ejercer un efecto inhibitorio mientras que la cantidad de tensioactivo libre presente en el medio (fuente de carbono para los microorganismos responsables de este proceso) depende de la CMC.

Dobarganes (Dobarganes, 1975), realizó ensayos de biodegradación a escala de laboratorio con alquiflenoles 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.

### 1.4.3.3 RUTAS DE BIODEGRADACIÓN

Los mecanismos aceptados como principales responsables de la destrucción de una molécula orgánica, son tres:  $\omega$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación y oxidación aromática.

El mecanismo de  $\omega$ -oxidación 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

## 1.4.4 TOXICIDAD

### 1.4.4.1 INTRODUCCIÓN

El aspecto más importante para determinar el impacto medioambiental de un producto químico es su ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en el caso de tensioactivos debido a su actividad superficial y el efecto negativo que causa en las membranas biológicas (Steber, 1995). Algunos tensioactivos pueden estar presentes en el medio acuático en concentraciones que causan efectos crónicos y agudos en organismos sensibles como crustáceos y peces (Ferrara, 2005; Roberts, 2007). Por ello es necesario determinar la toxicidad de estos compuestos para establecer los límites permisibles y evaluar el impacto que pueden ocasionar sobre el ecosistema que los recibe.

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 ensayos 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.

Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico. Es útil para la investigación básica del fenómeno de toxicidad, establecer criterios o patrones de calidad de aguas superficiales o efluentes, la evaluación del impacto ambiental y del riesgo ecológico y el monitoreo de las condiciones de un cuerpo de agua.

Generalmente, no es suficiente para proteger la biota registrar en un ecosistema dado las concentraciones de las sustancias químicas; los programas para monitorear tales sustancias suelen ser muy caros, y aquellas de alta toxicidad generalmente deben detectarse en concentraciones muy bajas, usando equipo costoso y personal muy entrenado; y en un solo ambiente puede haber cientos de contaminantes con efectos muchas veces no aditivos. Por lo tanto, se necesitan los ensayos biológicos que son relativamente simples, rápidos y económicos, y pueden brindar información adicional sobre el riesgo potencial, incluyendo efectos tóxicos como generación de cáncer, malformaciones, desórdenes de conducta, efectos acumulativos, antagonismos y sinergismos.

Existe una gran variedad de bioensayos para la determinación de la toxicidad de los compuestos en organismos acuáticos. Muchos de ellos conllevan mucho tiempo y no son rutinariamente reproducibles, por otra parte el uso de organismos superiores como especie de ensayo puede ser éticamente indeseable. Entre las especies utilizadas en estos ensayos de toxicidad se encuentran: alevines de peces (trucha y gripis), microcrustáceos (*Daphnia*, *Artemia*, *Gammarus*), algas (*Chlorella*, *Selenastrum*, *Phaeodactylum*) y bacterias (*Photobacterium*, *Spirillum*, *Pseudomonas*).

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

*putida*, microcrustáceos *Daphnia magna* y microalgas *Selenastrum capricornutum*, que cubren gran parte de los niveles tróficos y se consideran representativas de todos los organismos acuáticos (OCDE, 2001).

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.

#### 1.4.4.2 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, 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.

Generalmente los tensioactivos catiónicos son más tóxicos que los aniónicos, y los aniónicos más tóxicos que los no iónicos (Andersson, 2012).

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

Los tensioactivos catiónicos pueden alterar fácilmente las membranas bacterianas, y en general, tener actividad antimicrobiana. La superficie celular de las bacterias está generalmente cargada negativamente y la adsorción de compuestos anfifílicos catiónicos sobre esta superficie se ve favorecida por interacciones electrostáticas, junto con las interacciones hidrofóbicas de la cadena alquílica de tensioactivos que hacen que puedan penetrar en la parte hidrófoba de la membrana (Martín, 2014).

Para algas, la sensibilidad al tensioactivo determinado puede diferir dependiendo de la especie. Los tensioactivos pueden desnaturalizar 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 (Ernst, 1983) citado por Krogh (Krogh, 2003), demostraron que el incremento en la hidrofobicidad del tensioactivo reduce el crecimiento del alga *Chlamydomonas reinhardi*. 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).

Para peces, la exposición a altas concentraciones de tensioactivos conlleva la ruptura del epitelio branquial provocando la asfixia y fallos en la osmoregulación, mientras que la exposición a dosis subletales del tensioactivo provoca hiperlapsia del epitelio branquial, estrés oxidativo y daño en las mucosidades, lo que predispone al organismo al ataque microbiano (Susmi, 2010).

#### 1.4.4.3. 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 y disminuye con la ramificación (Kunjappu, 2012), 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 alquílica como se aprecia en la Tabla I.6 donde se muestra la  $IC_{50}$  para los diversos homólogos del LAS. Siendo  $IC_{50}$  la concentración que provoca efecto sobre el 50% de la población ensayada de *D. magna*. La ecotoxicidad de los tensioactivos normalmente aumenta logarítmicamente con un incremento lineal de la longitud de la cadena alquílica (Boeijs, 2006).

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

Homólogo	$IC_{50}$ , mg/L
Fenil C10	30-50
Fenil C11	20-30
Fenil C12	8-20
Fenil C13	5-10
Fenil C14	1-3

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 de 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 I.7 muestra, para una serie de alcoholes grasos etoxilados y de nonilfenoles polietoxilados, los valores de toxicidad frente a bacterias luminiscentes y frente a *Daphnia magna* (Ribosa, 1993).

Tabla I.7.- Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC<sub>50</sub>) y frente a *Daphnia magna* (IC<sub>50</sub>) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados

Unidades de OE	Alcohol graso C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub>		NPEO	
	EC <sub>50</sub> (mg/L)	IC <sub>50</sub> (mg/L)	EC <sub>50</sub> (mg/L)	IC <sub>50</sub> (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; Abu-Ghunmi, 2014):

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. Generalmente los tensioactivos iónicos son más tóxicos que los aniónicos.
5. 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*.

Tabla I.8.- Relación estructura-toxicidad para tensioactivos aniónicos y no iónicos

Ensayo de Toxicidad	Relación Estructura-Toxicidad	Tensioactivos	Referencia
<i>D. magna</i> . Condiciones duras. LC <sub>50</sub> , mol/L.	$\text{Log}(1/\text{LC}_{50}) = 0.7 (\text{Log } K_{ow}) + 2.23$	Aniónicos	(Roberts, 1991)
<i>D. magna</i> . Condiciones suaves. LC <sub>50</sub> , mol/L.	$\text{Log}(1/\text{LC}_{50}) = 0.64 (\text{Log } K_{ow}) + 2.44$	Aniónicos	(Roberts, 1991)
<i>Gammarus</i> . Condiciones duras. LC <sub>50</sub> , mol/L.	$\text{Log}(1/\text{LC}_{50}) = 0.76 (\text{Log } K_{ow}) + 2.46$	Aniónicos	(Roberts, 1991)
<i>D. magna</i> . Condiciones suaves. LC <sub>50</sub> , mol/L.	$\text{Log}(1/\text{LC}_{50}) = 0.71 (\text{Log } K_{ow}) + 2.27$	Aniónicos	(Roberts, 1991)
48-hr <i>D. magna</i> , EC <sub>50</sub> , μmol/L	$\text{Log}(EC_{50}) = 4.23 - 0.38 (R) + 0.10 (EO)$	AE	(Morrall, 2003)
48-hr <i>D. magna</i> , EC <sub>50</sub> , μmol/L	$\text{Log}(1/EC_{50}) = 0.87 (\text{Log } K_{ow}) - 4.87$	AE	(Morrall, 2003)
15-min <i>V. fischeri</i> , EC <sub>50</sub> , mg/L	$\text{Log}(EC_{50}) = -0.19 (R) + 0.15 (EO) + 1.88$	FAE	(Jurado, 2009)
48-hr <i>D. magna</i> , EC <sub>50</sub> , mol/L	$\text{Log}(EC_{50}) = -0.38 (R) + 0.1 (EO) - 1.77$	FAE	(Wong, 1997)

Los resultados de toxicidad para familias de tensioactivos con diferencias en su estructura molecular permiten aplicar expresiones matemáticas que relacionan la toxicidad con la

estructura del tensioactivo. Una de las más comunes es la relación entre  $EC_{50}$  como función de  $\log K_{OW}$  (coeficiente de partición octanol-agua), excepto para alcoholes grasos etoxilados para los cuales es común relacionar  $EC_{50}$  con la longitud de cadena (R) o grado de etoxilación (EO). En la Tabla I.8 se muestran algunas de las relaciones estructura-toxicidad encontradas en bibliografía.

### 1.5 ELIMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS MEDIANTE PROCESOS DE OXIDACIÓN AVANZADOS (AOPs).

En las estaciones de depuración de aguas residuales (EDARs) que utilizan sistemas biológicos, la presencia de compuestos recalcitrantes, como los tensioactivos, se convierte en un factor perjudicial. En muchos casos concentraciones altas de compuestos biorefractarios pueden inhibir el rendimiento y ser tóxicos para la biota responsable de la eliminación de los contaminantes, con diversas consecuencias y efectos negativos sobre los ecosistemas acuáticos, (Raj, 2005; Pokhrel, 2004).

De esta forma, los efluentes industriales que poseen compuestos recalcitrantes presentan un desafío para los sistemas de tratamiento biológico. Por los costos relativamente más bajos, muchas industrias aún optan por el tratamiento de los efluentes basado en procesos biológicos, que permiten obtener eficiencias razonables (Freire, 2000). El costo para implementar tratamientos biológicos es aproximadamente la mitad respecto a los procesos oxidativos avanzados (tratamiento químico) (Raj, 2005). Por esta razón, surge la necesidad de combinar procesos químicos y biológicos para un adecuado tratamiento de los efluentes.

La integración entre tratamiento biológico y químico se presenta con especial importancia en la práctica de la ingeniería química-sanitaria, principalmente desde el punto de vista económico para favorecer el tratamiento de los efluentes biorefractarios. Debido a la necesidad de tratamientos más eficientes de los efluentes industriales, con el fin de cumplir con los valores límites exigidos por la legislación ambiental, cada vez más exigente, se han desarrollado nuevas tecnologías durante las últimas décadas.

Entre las tecnologías más prometedoras se encuentran los denominados los Procesos de Oxidación Avanzada (AOPs). Se definen como "procesos de oxidación que implican la generación de radicales hidroxilo ( $OH\bullet$ ) en cantidad suficiente para interaccionar con los compuestos orgánicos del medio". Esta especie es altamente oxidante y no selectiva por lo que puede promover la degradación de varios compuestos contaminantes en pocos minutos (Huang, 1993). Incluso, los radicales  $OH\bullet$  pueden modificar la estructura química de compuestos orgánicos recalcitrantes convirtiéndolos en compuestos más simples, de menor masa molecular, menos tóxicos a los microorganismos y, consecuentemente, más biodegradables (Marco, 1997; Gogate, 2004; Rivas, 2011; Beltrán, 2012). Después del flúor, el radical libre  $OH\bullet$  es el oxidante con mayor potencial de oxidación (Huang, 1993).

El elevado número de sistemas que pueden generar estos radicales (Tabla I.9) hace que estos procesos de oxidación avanzada sean muy versátiles.

Los AOPs se clasifican como: homogéneos (catalizador - sustrato formando una única fase), y heterogéneos (catalizador - sustrato en estado líquido y sólido, formando un sistema de dos fases) (Teixeira, 2004).

Tabla I.9.- Tecnologías basadas en procesos de oxidación avanzada usadas para la depuración de aguas

Procesos no fotoquímicos	Procesos fotoquímicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Oxidación en agua sub/supercrítica</li> <li>▪ Reactivo Fenton (<math>\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2</math>)</li> <li>▪ Oxidación electroquímica</li> <li>▪ Radiólisis</li> <li>▪ Plasma no térmico</li> <li>▪ Ultrasonidos</li> <li>▪ Ozonización</li> <li>▪ Ozonización en presencia de de peróxido de hidrógeno</li> <li>▪ Ozonización catalítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fotólisis del agua con UV de vacío (UVV)</li> <li>▪ UV/peróxido de hidrógeno</li> <li>▪ Foto-Fenton</li> <li>▪ UV/ozono</li> <li>▪ Fotocatalisis heterogénea</li> </ul>

Los principales aspectos positivos y negativos del uso de los procesos oxidativos avanzados en el tratamiento de efluentes se presentan en la Tabla I.10 (Polezi, 2003).

Tabla I.10.- Principales aspectos positivos y negativos en la utilización de los procesos oxidativos avanzados para el tratamiento de efluentes (Polezi, 2003)

Aspectos positivos	Aspectos negativos
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ No transfieren de fase los contaminantes (como ocurre en las técnicas de membranas, carbón activado, entre otras), pero sí transforman químicamente los compuestos.</li> <li>▪ Poseen potencial para transformar productos refractarios en compuestos biodegradables.</li> <li>▪ Usualmente no hay generación de lodo.</li> <li>▪ Pueden proporcionar mineralización completa de algunos contaminantes.</li> <li>▪ En algunos casos, consumen menos energía que otros métodos (por ejemplo, en comparación con la incineración).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pueden formar subproductos de reacciones indeseables en algunos casos.</li> <li>▪ Necesitan, en algunos procesos, tiempos de reacción grandes.</li> <li>▪ Los costos de inversión y operación pueden ser elevados.</li> <li>▪ Es necesario mano de obra especializada.</li> </ul>

Los procesos oxidativos avanzados se presentan como una excelente opción para el tratamiento de efluentes industriales, pues permiten la eliminación y/o modificación de los compuestos recalcitrantes en constituyentes más biodegradables (Mantzavinos, 2004; Rivas, 2011). La remoción de color, parámetro de difícil reducción por tratamientos convencionales, se consigue aplicando esta tecnología. Las macromoléculas orgánicas, tales como los polímeros solubles, poseen grandes dimensiones para penetrar en las paredes de las células, razón que impide la oxidación biológica de estos compuestos (Mantzavinos, 2004). Sin embargo, el tratamiento químico puede oxidar y romper estas grandes moléculas orgánicas, convirtiéndolas en compuestos intermediarios menores, esto es, cadenas pequeñas de ácidos orgánicos que son capaces de penetrar en las células y ser fáciles de biodegradar. La velocidad de oxidación biológica generalmente se aumenta en función de la disminución del tamaño molecular de los compuestos. Algunos trabajos han mostrado que diferentes AOPs pueden oxidar parcialmente varios tipos de compuestos refractarios, aumentando la relación  $\text{DBO}_5/\text{DQO}$  y/o la tasa de utilización de oxígeno propiciando, consecuentemente, un mejor tratamiento biológico de los efluentes (Bowers, 1989; Bandara, 1997; Yeber, 1999; Raj, 2005; Momenti, 2006; Sanches, 2010).

En este trabajo se abordará el estudio de la eliminación de tensioactivos mediante un AOP homogéneo, tratamiento con ozono.

### 1.5.1 TRATAMIENTO CON OZONO

El ozono comenzó a ser utilizado como agente bactericida en la depuración de aguas residuales destinadas a consumo humano a principios del siglo XX en Niza (Francia), y en la actualidad constituye uno de los AOPs más utilizados. El ozono tiene la habilidad de desinfectar, oxidar, o ser usado en combinación con otras tecnologías o reactivos, y posee múltiples aplicaciones en aguas potables y residuales, contaminación del aire, medicina, etc. En el tratamiento de aguas, en particular, presenta importantes ventajas, como son: i) la eliminación de los compuestos que provocan la presencia de olor, sabor y color en el agua, ii) la oxidación de contaminantes inorgánicos, iii) la eliminación de algas y otros microorganismos acuáticos, iv) la oxidación de micro contaminantes orgánicos, v) su uso no incrementa la presencia de compuestos organoclorados, como ocurre al usar el cloro como agente depurador y vi) provoca un aumento del rendimiento de los procesos de adsorción y coagulación. Por el contrario, su aplicación a gran escala, en el tratamiento de residuos líquidos industriales, no está muy extendida debido al elevado coste económico y la complejidad química de estos efluentes. Sin embargo, la baja eficiencia de los sistemas convencionales de tratamientos de efluentes industriales en la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos a los niveles que la nueva legislación ambiental exige, ha convertido el uso del ozono en una alternativa atractiva para la depuración de los mismos.

Excelentes trabajos, como por ejemplo los publicados por Langlais y Col. (Langlais, 1991) y Beltrán (Beltrán, 2004), recogen gran cantidad de información sobre los aspectos generales del ozono.

#### 1.5.1.1 EL OZONO

En 1785, el olor procedente de las descargas eléctricas de las tormentas llevó a Martinus Van Marum a sospechar la presencia de un nuevo compuesto. Fue en 1840 cuando Christian Schönbein finalmente descubrió el ozono, aunque su estructura química como triatómica no fue confirmada hasta 1872.

Desde el punto de vista químico, el ozono,  $O_3$ , es una forma alotrópica del oxígeno, formada por tres átomos de este elemento; además de ser una especie diamagnética, el ozono a temperatura ambiente es un gas azul pálido e inestable con un característico olor picante, perceptible a menudo durante las tormentas eléctricas, así como en la proximidad de equipos eléctricos. Los resultados experimentales muestran un ángulo de enlace de  $116.8 \pm 0.5^\circ$  y una distancia interatómica de 127.8 pm entre el oxígeno central y cada uno de los terminales (Greenwood, 1997). En la Figura I.7 se exponen las dos formas resonantes de la molécula de ozono según la teoría de enlace de valencia.

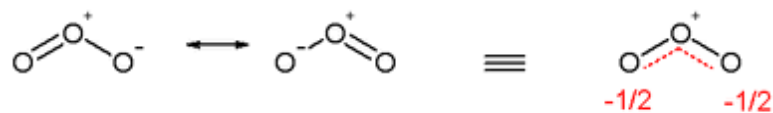


Figura I.7.- Estructura de la molécula del ozono

A una temperatura de  $-12^\circ\text{C}$  condensa a un líquido azul intenso. En condiciones normales de presión y temperatura, el ozono es trece veces más soluble en agua que el oxígeno, pero debido a la mayor concentración de oxígeno en aire, éste se encuentra disuelto en el agua en mayor medida que el ozono.

Su función más conocida es la de protección frente a la peligrosa radiación ultravioleta del sol; pero también debido a su configuración es una especie fuertemente oxidante ( $E^\circ=$

+2.08 V), y su tendencia natural es transferir un átomo de oxígeno y liberar O<sub>2</sub>. Es, después del flúor, el compuesto más oxidante, debido a su facilidad para captar electrones. De rápida descomposición y, a igualdad de condiciones, más estable en agua que en aire.

El ozono se forma naturalmente en la estratósfera (a 20 km sobre el nivel del mar y en pocos kilómetros de ancho) donde rodea a la Tierra y protege al planeta de las radiaciones UV-B y UV-C. La generación espontánea del ozono se debe a la combinación del oxígeno bimolecular y el oxígeno atómico, una reacción que comienza a desarrollarse desde aproximadamente a 20 km por encima del nivel del mar hasta 70 km sobre la superficie de la tierra, donde existen las condiciones favorables para su formación (Beltrán, 2004).

Dada la inestabilidad del compuesto, su generación para su posterior uso debe ser llevada a cabo en el sitio de aplicación mediante unos generadores. El método más ampliamente utilizado son las descargas en corona, o también conocido como “descargas eléctricas silenciosas”. Consiste en pasar oxígeno en forma gaseosa a través de dos electrodos separados por un dieléctrico y un hueco de descargas. Se aplica un voltaje a los electrodos, causando que un electrón fluya a través del hueco de descargas. Esos electrones suministran la energía para disociar las moléculas de oxígeno, produciéndose así la formación de ozono.

El ozono generado in situ es utilizado para múltiples objetivos destacando su uso en el tratamiento de aguas:

- En el caso de las aguas potables, el ozono es típicamente empleado en una pre-desinfección para el control de algas e inactivación de bacterias y virus (mata a una variedad de microbios, incluyendo *Cryptosporidium*, virus de la polio y hepatitis A, *E. coli*, salmonela y bacterias del cólera), y como pre-oxidación y/o oxidación intermedia de la materia orgánica e inorgánica para eliminación de compuestos que proporcionan sabor, olor y color al agua. Además, es utilizado para la eliminación de la turbidez, iones metálicos y reduce los niveles de trihalometanos (THM) y precursores orgánicos relacionados.
- En el tratamiento de aguas residuales, el ozono se emplea en la desinfección (reutilización), oxidación de compuestos inorgánicos (eliminación de sustancias tóxicas como el cianuro), oxidación de compuestos orgánicos (oxidación parcial del TOC y sustancias tóxicas) y la eliminación de partículas.
- Eliminación de metales pesados, como hierro, cadmio, cobalto, cromo, cobre, manganeso, níquel y zinc. Una vez que han sido oxidados, estos metales forman compuestos menos solubles que precipitan y pueden ser separados por filtración.
- Limpieza y desinfección de equipos e instalaciones industriales. (Pascual, 2007). El uso del ozono presenta una serie de ventajas frente a los procedimientos comunes que implican detergentes y desinfectantes comunes (Jurado-Alameda, 2012):
  - Se descompone rápidamente y no genera residuos tóxicos o indeseables.
  - Oxida parcialmente la materia orgánica y moléculas de tensoactivo reduciendo la DQO y facilitando el posterior tratamiento biológico.
  - Permite una reducción de la temperatura de lavado ya que es más soluble a bajas temperaturas.
  - Evita la necesidad de almacenar grandes cantidades de productos de limpieza y desinfectantes ya que es generado *in situ*.
- Actualmente, la ozonización también es empleada para la eliminación de contaminantes emergentes como pesticidas (Chu, 2003; Bourgin, 2013; Derco, 2013; Bajwa, 2014; Heleno, 2014)), compuestos farmacéuticos (Huber, 2005; Rosal, 2008; Rivas, 2011; Rivas, 2012; Beltrán 2012), tintes (Zhao, 2011; Bernal, 2013; Sharma, 2013; Parsa, 2014; Pérez, 2014), tensoactivos (Beltrán, 2000a; Beltrán, 2000b; Qu,

2011; Tehrani, 2012; Jurado-Alameda, 2012; Lechuga, 2012; Rivera-Utrilla, 2012; Schvadchina, 2013; Kanazawa, 2013; Kim, 2013, Lechuga, 2014), y otros compuestos xenobióticos (Pocostales, 2012; Rodríguez, 2012; Olak-Kucharczyk, 2012; Olak-Kucharczyk, 2013).

### 1.5.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN

Debido a su alta reactividad, el ozono puede interactuar con un gran número de sustancias orgánicas e inorgánicas mediante reacción directa de oxidación reducción, cicloadición, sustitución o adición nucleofílica (Vollhardt, 1996; Eisenhauer, 1968; Riebel, 1960). La reacción directa entre el ozono y un determinado compuesto no es la única vía por la cual el ozono puede actuar para degradar contaminantes, sino que, como el ozono es muy inestable en disolución acuosa se produce descomposición espontánea mediante un complejo mecanismo en cadena (Tabla I.11) donde intervienen distintas especies radicalarias (Stahelin, 1982). Los radicales originados son de gran interés en los tratamientos de aguas, puesto que, algunos como el radical hidroxilo HO $\cdot$ , presentan una reactividad aún mayor que el ozono y ejercen, por lo tanto, un papel fundamental en la eliminación de contaminantes en disolución (Hoigné, 1976).

Tabla I.11 Mecanismos de reacción en la ozonización: etapas de reacción y constantes cinéticas (Zhao, 2011)

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

Cuando este gas es inyectado en el agua, puede ejercer su poder oxidante mediante dos mecanismos de acción:

1. Oxidación directa de los compuestos mediante el ozono molecular. El ozono molecular reacciona instantáneamente con una variedad de compuesto mostrando una aceptable cinética de segundo orden (Jiang, 2010).
2. Oxidación por radicales libres hidroxilo (OH $\cdot$ ). Estos radicales libres, generados en el agua por combinación de ésta con las moléculas de ozono (Figura I.8), constituyen uno de los más potentes oxidantes, con un potencial de 2.80 V. No obstante, presentan el inconveniente de que su vida media es del orden de microsegundos, aunque la oxidación que llevan a cabo es mucho más rápida que la oxidación directa por moléculas de ozono.

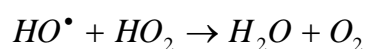
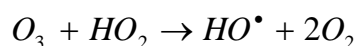
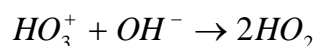
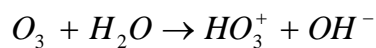


Figura I.8.- Reacciones de formación de radicales libres OH-

La descomposición del ozono en radicales hidroxilo puede verse facilitada de numerosas maneras, básicamente mediante la combinación del ozono con otro oxidante como peróxido de hidrógeno (Mizuno, 2011), presencia de radiación, y/o adición de algún catalizador adecuado como carbón activo, pervskita (Carbajo, 2006), etc.

De los oxidantes más utilizados en el tratamiento de aguas, los radicales libres de hidroxilo y el ozono tienen el potencial más alto (son los más oxidantes). Ello explica su gran capacidad para oxidar materia orgánica del agua, eliminar olores y sabores, y degradar compuestos químicos de diversa naturaleza.

Dependiendo de las condiciones del medio, puede predominar una u otra vía de oxidación:

- En condiciones de bajo pH, predomina la oxidación molecular.
- Bajo condiciones que favorecen la producción de radicales hidroxilo, como es el caso de un elevado pH, exposición a radiación ultravioleta, o por adición de peróxido de hidrógeno, empieza a dominar la oxidación mediante hidroxilos.

### 1.5.1.3 TOXICOLOGÍA

En cuanto a su ficha toxicológica, el ozono está clasificado únicamente como Agente Irritante Xi en aire, no estando clasificado como carcinogénico. Esta clasificación como agente irritante se refiere exclusivamente a sus concentraciones en aire, es decir, a los problemas derivados de su inhalación, que dependen de la concentración a la cual las personas están expuestas, así como del tiempo de dicha exposición. La normativa emitida por la OMS recomienda una concentración máxima de ozono en aire, para el público en general, de 0.05 ppm (0.1 mg/m<sup>3</sup>).

Salvo que se almacene líquido a altas presiones, el ozono es generado *in situ*, no pudiendo existir escapes superiores a la producción programada en los generadores, ya que estos únicamente producen el gas, no lo acumulan. Los valores para producir efectos agudos letales son muy altos, de 15 ppm, concentraciones prácticamente inalcanzables en tratamientos convencionales.

Disuelto en agua, el ozono es inocuo, dado que su acción sobre la materia orgánica provoca su rápida descomposición. En el caso de tratamientos a altas presiones podría producirse la liberación de ozono al aire, apareciendo entonces en la superficie de intercambio agua-aire concentraciones que podrían considerarse peligrosas; pero los tratamientos convencionales no se realizan en estas condiciones. De hecho, el ozono se encuentra autorizado como coadyuvante en el tratamiento de aguas potables según la [Resolución de 23 de abril de 1984](#) del Ministerio de Sanidad y Consumo (BOE, 1984) estando asimismo reconocido como desinfectante en la potabilización de aguas por la norma [UNE-EN 1278:2010](#) (UNE-EN 1278:2010). En palabras textuales de la norma española:

“El ozono se auto-descompone en el agua. Por tanto, a las dosis habitualmente aplicadas, no se requiere generalmente ningún proceso de eliminación. [...]”

Asimismo, el [Real Decreto 140/2003](#), de 7 de febrero, (Real Decreto 140/2003) por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, incluye el ozono como sustancia para el tratamiento del agua, ya que cumple con la norma UNE-EN correspondiente y en vigencia, incluida en el Anexo II del RD: Norma UNE-EN 1278:2010: Productos químicos utilizadas en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Ozono. (UNE-EN 1278:2010).

#### 1.5.1.4 NORMATIVA

El uso del ozono está regulado según sus usos, encontrándose incluido en:

- [Real Decreto 140/2003](#), de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (Real Decreto 140, 2003)
- [Norma UNE-EN 1278:2010](#) de productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada a consumo humano: Ozono. (UNE-EN 1278:2010).
- [Real Decreto 865/2003](#), por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. (Real Decreto 865/2003).
- [NTP 538](#) del INSHT. Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua. (NTP 538, 1999)
- [Norma UNE 400-201-94](#), recomendaciones de seguridad en generadores de ozono para tratamiento de aire. (UNE 400-201-94)
- [Real Decreto 168/1985](#), de 6 de febrero, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria sobre condiciones generales de almacenamiento frigorífico de alimentos y productos alimentarios. (Real Decreto 168, 1985).

#### 1.5.1.5 OXIDACIÓN AVANZADA DE TENSIOACTIVOS CON OZONO

A pesar de la gran eficiencia que puede presentar el ozono en determinados sistemas, es necesario destacar la insuficiente capacidad del ozono para lograr la degradación de algunos contaminantes como los tensioactivos. Narkis y col. (Narkis, 1987) observaron que el tratamiento con ozono era insuficiente para la eliminación de tensioactivos no iónicos, si bien favorecía su biodegradación; asimismo, otros autores han detectado la falta de reactividad del ozono con los tensioactivos catiónicos saturados (Corless, 1989). En cuanto a los tensioactivos aniónicos, aunque algunos investigadores consiguieron una alta degradación de los lineal alquilbenceno sulfonatos mediante el uso del ozono (Evans, 1963), posteriormente, se determinó que los valores de la constante de velocidad de la reacción directa son bajos (Beltrán, 2000a), lo que indica que la degradación se lleva a cabo, principalmente, gracias a los radicales obtenidos por vía indirecta.

En los últimos 30 años, numerosos estudios sobre la aplicación de ozono en la eliminación de tensioactivos han aportado resultados muy alentadores (Narkis, 1980; Ledakowicz, 1997; Ungar, 1997; Gioldowska-Bulska, 2004; Zhao, 2011; Tehrani, 2012; Lechuga, 2014). La mayoría de los tensioactivos se ven atacados por el ozono, descomponiéndose entre un 78% y un 98% (Gioldowska-Bulska, 2004).

La velocidad de dicha descomposición depende generalmente de:

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



El ozono es un fuerte oxidante de tensioactivos, especialmente en el tratamiento de cadenas de oxietileno (Narkis, 1980; Narkis, 1987). Las moléculas con un alto número de grupo oxi-etilénicos se reducen, por norma general, más que en el caso de tensioactivos con cadenas cortas. (Gieldowska, 2004).

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

El análisis de la ozonización de alcoholes etoxilados simples mostró un descenso significativo de la polaridad de la disoluciones (Brambilla, 2004). Este fenómeno ocurre como resultado del descenso de los grupos de cadenas polietoxiladas, principalmente transformadas a ácidos carboxílicos de cadena corta. También se detectaron hidroxi y di-hidroxi ácidos carboxílicos, ceto-ácidos, ácidos di-carboxílicos, ácido glioxálico (formado como resultado de la oxidación de ácido acético y/o la ruptura de las cadenas de oxietileno), di-, tri- y tetraetilenglicol, mono- y di-ácidos correspondientes a di- y tri-etilenglicoles. Las cadenas alifáticas también mostraron descomposición acompañadas de la formación de ácidos carboxílicos. En todos los casos, la velocidad de formación de estos compuestos aumenta con el incremento del pH de la disolución como resultado de verse favorecidas las reacciones radicalarias, principalmente del radical HO.

Cabe destacar el alto número de derivados del ozono que se producen cuando este está en disolución acuosa (Glance, 1986). Como puede verse en la Figura I.9 el ozono da lugar a un alto número radicales e iones.

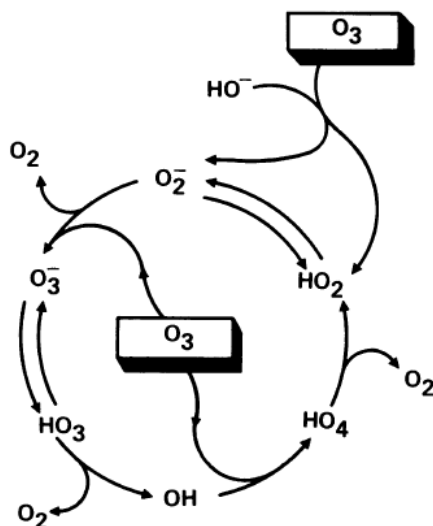


Figura I.9.- Ciclo de los mecanismos de descomposición del ozono en disolución acuosa iniciado por el ion hidroxilo. (Glance, 1986)

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

El ozono como tal ( $O_3$ ) ataca los anillos aromáticos, alquenos y alquinos. Calvosa y Col., (Calvosa, 1991) encontraron que algunos componentes de una mezcla de productos en los que estaban presentes grupos nonilo mostraron un incremento de la polaridad tras la

ozonización respecto de la mezcla sin ozonizar. Esto pudo probar la evidencia de la hidroxilación de grupos aromáticos. Sin embargo el ataque de radicales HO<sup>·</sup>, incluso sobre grupos aromáticos, es más rápido que en el caso del ozono (Pelizzetti, 1993).

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

Puede decirse por tanto que el uso de ozono en disolución acuosa implica la existencia, de como mínimo, las reacciones mostradas en la tabla I.11.

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

La generación de compuestos oxigenados como ácidos carboxílicos de cadena corta, reducen el carácter hidrófobo del tensioactivo original, disminuyendo de este modo la actividad interfacial. El alquil benceno sulfonato (LAS) es la única excepción, posiblemente debido a que la apertura del anillo aromático en su parte hidrófoba no afecta significativamente al carácter anfifílico de la molécula (Jurado-Alameda, 2012).

La ozonización de disoluciones de tensioactivo causa descensos en el TOC y COD residuales, aunque hay estudios que muestran que dichos descensos son bajos, lo que implica que el grado de mineralización de tensioactivos tras la ozonización es relativamente bajo (Ledakowicz, 2005). La ozonización de disoluciones de tensioactivos, no llega por tanto a una mineralización completa hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Narkis, 1987, Tehrani, 2012, Jurado-Alameda, 2012). Puede decirse por tanto que el tratamiento, sólo con ozono, es inadecuado para la eliminación total de tensioactivos, y en particular de tensioactivos no iónicos. Por tanto, este comportamiento indica la importancia de aplicar ozono cuando el propósito es aumentar la biodegradabilidad de efluentes que contienen tensioactivos, facilitando el tratamiento posterior con procesos biológicos, es decir, el ozono como oxidante parcial.

#### 1.5.1.6 BIODEGRADACIÓN Y TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS TRAS LA OZONIZACIÓN

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

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

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

- Los productos de la descomposición de los tensioactivos tenían mayor toxicidad. Los compuestos orgánicos de bajo peso molecular formados por la ozonización, como por ejemplo el nonilfenoles polietoxilados de cadenas cortas, varios tipos de

ácidos, etc., presentaron mayor toxicidad sobre bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri*.

- La ozonización solo mejoró ligeramente la biodegradabilidad de las disoluciones de tensioactivos.

Sin embargo, y debido a que existen pocos estudios sobre estos aspectos, no se puede generalizar, pues en función del tensioactivo de partida se obtendrán unos productos u otros. Es en este aspecto donde se centra la presente Tesis Doctoral, en la relación existente entre la estructura de un tensioactivo y la evolución de la biodegradabilidad y toxicidad tras ozonizar.

## 1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, D.C. (1962). The colorimetric determination of anionic surface-active materials in water. *Analyst*, 87:286-293.

Abu-Ghunmi, L., Badawi, M., Fayyad, M. (2014). Fate of Triton X-100 applications on water and soil environments: A review. *Journal of Surfactants and Detergents*, Article in Press.

Andersson, M. (2012). Acute toxicity to *Daphnia magna* in river water; Investigating mitigation and bioavailability of pure cationic surfactants and mixtures with SPME. Degree project for Master of Science 45 hec. Department of Biological and Environmental Sciences. University of Gothenburg.

Bailón, R. (2003). Ingeniería del conocimiento y vigilancia tecnológica aplicada a la investigación en el campo de los tensioactivos. Desarrollo de un modelo cuantitativo unificado. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.

Bajwa, U., Sandhu, K.S. (2014). Effect of handling and processing on pesticide residues in food- A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51:201-220.

Bandara, J., Pulgarin, C., Peringer, P., Kiwi J. (1997). Chemical (photo-activated) coupled biological homogeneous degradation of p-nitro-o-toluene-sulfonic acid in flow reactor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 11:253-263.

Beltrán, F.J., García-Araya, J.F., Álvarez, P.M. (2000a). Sodium dodecylbenzenesulfonate removal from water and wastewater. 1. Kinetics of decomposition by ozonation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39:2214-2220.

Beltrán, F.J., García-Araya, J.F., Álvarez, P.M. (2000b). Sodium dodecylbenzenesulfonate removal from water and wastewater. 2. Kinetics of the integrated ozone-activated sludge system. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39:2221-2227.

Beltrán, F.J. (2004). Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems. Lewis Publishers. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Beltrán, F.J., Aguinaco, A., García-Araya, J.F. (2012). Application of ozone involving advanced oxidation processes to remove some pharmaceutical compounds from urban wastewaters. *Ozone: Science & Engineering*, 34:3-15.

- Bernal, M., Romero, R., Roa, G., Barrera-Díaz, C., Torres-Blancas, T., Natividad, R. (2013). Ozonation of indigo carmine catalyzed with Fe-pillared clay. *International Journal of Photoenergy*, Article number 918025.
- 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 sean 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., Cano, M., Marshall, S., Belanger, S., Van Compernelle, R., Dorn, P., Gümbel, H., Toy, R., Wind, T. (2006). Ecotoxicity quantitative structure-activity relationships for alcohol ethoxylate mixtures based on substance-specific toxicity predictions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:75-84.
- Boiteux, J.P. (1984). Dosage colorimétrique d'agents de surface amphoterés et étude du compartement d'une alkyl amido betaine en milieu naturel. *La Revista italiana delle sostanze grasse*, 61:491-495.
- 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.
- Bourgin, M., Albet, J., Violleau, F. (2013). Study of the degradation of pesticides on loaded seeds by ozonation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1:1004-1012.
- Bowers, A.R, Gaddipati, P., Eckenfelder, P.W.J., Monsen, R.M. (1989). Treatment of toxic or refractory wastewaters with hydrogen peroxide. *Water Science and Technology*. 21:477-486.
- Braga, J.K., Varesche, M.B.A. (2011). Commercial laundry water characterization for anaerobic treatment in fluidized bed reactor. X Oficina e Seminário Latino Americano de Digestão Anaeróbia (DAAL), Ouro Preto.
- Buschmann, N., Kruse, A., Wodarczak, S. (1995). Analytical methods for alkylpolyglucosides. I: Colorimetric Determination. *Tenside Surfactants Detergents*, 32(4): 336-339.

- Calvosa, L., Monteverdi, A., Rindone, B., Riva, G. (1991). Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation. *Water Research*, 25:985-993.
- Carbajo, M., Rivas, F.J., Beltrán, F., Álvarez, P., Medina, F. (2006). Effects of different catalysts on the ozonation of pyruvic acid in water. *Ozone: Science & Engineering*, 28:229-235.
- 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 (1989). Recomendación de la Comisión 89/542/CEE de 13 de septiembre de 1989 relativa al etiquetado de detergentes y productos de limpieza. DO L 291/55 de 1989.
- CESIO (2008). The relevance of the 10d window in the context of the assessment of ready biodegradability for surfactants. European Committee of Organic Surfactants and their Intermediates
- CESIO (2011). CESIO Statistics 2011. European Committee of Organic Surfactants and their Intermediates.
- Ceresana (2012). Market study: Surfactants. Ceresana Research.
- Chu, W., Ching, M.H. (2003). Modeling the ozonation of 2,4-dichlorophoxyacetic acid through a kinetic approach. *Water Research*, 37:39-46.
- Corless, C., Reynolds, G., Graham, N., Gibson, T.M., Haley, J. (1979). Aqueous ozonation of a quaternary cationic surfactants. *Water Research*, 23:1367-1371.
- Crabb, N., Persinger, H. (1964). The determination of poly(oxyethylene) nonionic surfactants in water at the parts per million level. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41: 752-755.
- Csherháti, T., Forgács, E., Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28: 337-348.
- Decisión de la Comisión 383/2011, 2011. Decisión de la Comisión de 28 de junio de 2011 por la que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica de la UE a los productos de limpieza de uso general y a los productos de limpieza de cocinas y baños. DO L 169/52 29.06.2011.
- Delanghe, B., Merkras, C.I., Graham, N.J.D. (1991). Aqueous ozonation of surfactants: a review. *Ozone: Science & Engineering*, 13:639-673.

- Deleu, M., Paquot, M. (2004). From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6-7):641-646.
- Derco, J., Valičková, M., Šilhárová, K., Dudáš, J., Luptáková, A. (2013). Removal of selected chlorinated micropollutants by ozonation. *Chemical Papers*, 67:1585-1593.
- Di Croacia, A., Casassa, F., Crescenzi, C., Marcomini, A., Samperi, R. (1999). Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters. *Environmental Science & Technology*, 22:4119-4125.
- 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.
- Eisenhauer, H.R. (1968). Ozonation of phenolic wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, 40(11):1877-1899.
- Ernst, R., Gonzales, C.J., Arditti, J. (1983). Biological effects of surfactants: Part 6. Effects of anionic, non-ionic and amphoteric surfactants on a green alga (*Chlamydomonas*). *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological*, 31:159-175.
- Evans, F.L., Ryckman, D.W. (1963). Ozonated treatment of wastes containing ABS. Proceedings 18th Industrial Waste Conference, Purdue University. *Engineering Extension*, 115:141-157.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Funari, E. (2005). Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy) *Chemosphere*, 59:1145-1150.
- Forgiarini, A., Esquena, J., González, C., Solans, C. (2002). The relation between phase behavior and formation of narrow size distribution W/O emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1-3): 209-217.
- Freire, R. S., Pelegri, R., Kubota, L.F., Duran, N. (2000). Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, 23: 504-511.
- Gieldowska-Bulska, A., Perkowski, J., Kos, L. (2004). The application of ozone in the decomposition of aqueous solutions of nonionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 26:217-225.
- Glace, W. (1986). Reaction products of ozone: A review. *Environmental Health Perspectives*, 69:151-157.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. (1997). Chemistry of elements. Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Gogate, P.R., Pandit, A.B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances in Environment Research*, 8:553-597.
- Han, W., Zhou, W. (2013). Study on the treatment of surfactant wastewater by anaerobic biological filter. *Advanced Materials Research*, 671-674:2754-2759.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tylor, T., Zaman, N. (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:1993-2002.

- Hedreul, C., Frens, G. (2001). Foam stability. *Colloids and Surfaces A*, 186(1-2): 73-82.
- Heleno, F.F., De Queiroz, M.E.L.R., Neves, A.A., Freitas, R.S., Faroni, L.R.A., De Oliveira, A.F. (2014). Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazole from strawberries and on their quality. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49:94-101.
- Hoigné, J., Bader, H. (1976). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research*, 10:377-386.
- Huang, C.P., Dong, C., Tang, Z. (1993). Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management*, 13:361-377.
- Huber, M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mcardell, C., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T., Von Gunter, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewaters effluents: a pilot plant study. *Environmental Science & Technology*, 39:4290-4299.
- IHS. (2013). Chemical Insight and Forecasting: Planning Services. Specialty Chemicals Update Program. IHS Chemical.
- Jiang, J.L., Yue, X.A., Chen, Q.F., Gao, Z. (2010). Determination of ozonation reaction rate constants of aromatic pollutants and QSAR study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85:568-572.
- Jobling, S., Noylan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, 32:2498-2506.
- 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. *Tenside Surfactants Detergents*, 39:154-159.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10:145-153.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-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 Science and Technology*, 59:2351-2358.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jimenez, J.L., Ríos, F. (2011). Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation tests. *Water Environment Research*, 83(2):154-161.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Lechuga, M., Ríos, F. (2012). Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10(1):1-7.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Ríos, F., Lechuga, M. (2013). Aerobic biodegradation of surfactants. In R. Chamy, F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*. (pp.66-81). InTech, Rijeka.
- Jurado-Alameda, E., Vicaria, J.M., Altmajer-Vaz, D., Luzón, G., Jiménez-Pérez, J.L., Moya-Ramírez, I. (2012). Ozone degradation of alkylbenzene sulfonate in aqueous solutions

- using a stirred tank reactor with recirculation. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47:2205-2212.
- Kanazawa, S., Geng, S., Kawa, Akamine, S., Ichiki, R. (2013). Improvement of surfactant decomposition by superposition of pulsed discharge on the water and ozone injection. *International Journal of Plasma Environmental Science and Technology*, 7:21-25.
- Kim, H., Yang, S., Yang, H. (2013). Surfactant-enhanced ozone sparging for removal of organic compounds from sand. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 48:526-533.
- Kimerle, R.A., Swisher, R.D. (1977). Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Research*, 11:31-37.
- Kunieda, H., Ozawa, K., Aramaki, K., y Solans, C. (1998). Formation of microemulsions in mixed ionic-nonionic surfactants systems. *Langmuir*, 14(2): 260-263.
- Kolvenbach, B.A., Helbling, D.E., Kohler, H.E.P., Corvini, P.F.-X. (2014). Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27:8-14
- Krogh, K., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B., Vejrup, P. (2003). Environmental properties and effects of nonionic surfactants adjuvants in pesticide: a review. *Chemosphere*. 50:871-901.
- Langlais, B., Reckhow, D.A., Brink, D.R. (1991). Ozone in water treatment. Application and engineering. Cooperative Research Report. Lewis publishers. Boca Raton. Florida.
- Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Fernández-Arteaga, A., Burgos, A., Ríos, F. (2012). Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants. *Procedia Engineering*, 42:1038-1044.
- Lechuga, M., Fernández-Arteaga, A., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Burgos, A., Ríos, F. (2014). Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(2):363-370.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J. (1997). Kinetics of ozonation of non-ionic detergent in aqueous solutions. Proceedings 13<sup>th</sup> Ozone World Congress, 1:343-348, Kyoto.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J., Bulska, A., Jamroz, J., Sencio, B. (2005). Ozonation impact on degradation and toxicity of non-ionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 27:437-445.
- Levinson, M.I. (2009). Surfactant production: present realities and future perspectives. In U. Zoller (Ed.) Handbook of detergents part F: production, (vol.142, pp.1-38). CRC, Boca Raton, Florida.
- Mantzavinos, A., Psillakis, E. (2004). Review enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79:431-454.
- Marco, A., Esplugas, S., Saum, G. (1997). How and why combine chemical and biological process for wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 35:321-327.
- Markets and markets (2013). Surfactants market by product types [anionic, non-ionic, cationic, amphoteric], substrates [synthetic/petrochemical, bio-Based/ natural/ green],



- geography & applications – Global industry trends and forecasts to 2017. *Markets and markets*.
- Martín, G.R. (1995). Compuestos orgánicos en las aguas. *Ingeniería Química*, 6:159-165.
- Martín, V.I., De la Habaa, R.R., Ventosaa, A., Congiub, E., Ortega-Calvob, J.J., Moyá, M.L. (2014). Colloidal and biological properties of cationic single-chain and dimeric surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114-:247-254.
- Matthijs, E., Hennes, E.C. (1991). Determination of surfactants in environmental samples. *Tenside Surfactants Detergents*, 28(1): 22-27.
- Méndez Díaz, J.D. (2008). Eliminación del surfactante dodecibencenosulfonato sódico de las aguas mediante adsorción en carbones activados, ozonización catalizada y fotooxidación. Tesis doctoral. Departamento de Química Inorgánica. Universidad de Granada.
- Mizuno, T., Ohara, S., Nishimura, F., Tsuno, H. (2011). O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process for both removal of odorous algal-derived compounds and control of bromate ion formation. *Ozone: Science & Engineering*, 33:121-135.
- Momenti, T. (2006). Processo Anaeróbio Conjugado com Processos Oxidativos Avançados (POA) no Tratamento dos Efluentes do Processo Industrial de Branqueamento da Polpa Celulosica. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Morrall, D., Belanger, S., Dunphy, J. (2003). Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:381-3893.
- Mungray, A.K., Kumar, P. (2009). Mass balance of anionic surfactants through up-flow anaerobic sludge blanket based sewage treatment plants. *Process Safety and Environmental Protection*, 87:254-260.
- Narkis, N., Scheider-Rothel, M. (1980). Ozone-induced biodegradability of non-ionic surfactant. *Water Research*, 14:1225-1232.
- Narkis, N., Ben-David, B., Schneider-Rotel, M. (1987). Non-ionic surfactants interactions with ozono. *Tenside Surfactants Detergents*, 24:200-210.
- Nielsen, A., Borch, K., Westh, P. (2000). Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1497:321-331.
- Niki, E., Yamamoto, E., Saito, T., Nagano, K., Yokoi, S., Karniya, Y. (1983). Ozonization of organic compounds. VII. Carboxylic acids, alcohols and carbonyl compounds. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 6:223-228
- Niqui-Arroyo, J.L., Bueno-Montes, M., Ortega-Calvo, J.J. (2011). Biodegradation of anthropogenic organic compounds in natural environments. Biophysico-chemical processes of anthropogenic organic compounds in environmental systems. In B. Xing, N. Senesi, P.M. Huang (Eds.), *IUPAC Series on Biophysico-chemical Processes in Microenvironmental Systems*, (vol. 3, pp.483-501). John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- NTP 538, 1999. NTP 538: Legionelosis: medidas de prevención y control en instalaciones de suministro de agua. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

- OCDE (1976). Environment Directorate. Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in a synthetic detergents, OCDE. Paris. Francia.
- OCDE (1981). OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals, Vol. 1, Sección 3: Degradation and Acumulation, OCDE. Paris. Francia.
- OCDE (2001). OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N° 27. Guidance document on the use of the harmonised system for the classification of chemicals which are hazardous for the aquatic environment, OCDE. Paris. Francia.
- Olak-Kucharczyk, M., Miller, J.S., Ledakowicz, S. (2012). Ozonation kinetics of o-phenylphenol in aqueous solutions. *Ozone: Science and Engineering*, 34:300-305.
- Olak-Kucharczyk, M., Miller, J.S., Ledakowicz, S. (2013). Decomposition of meta-and para-phenylphenol during ozonation process. *Chemical Papers*, 1157-1163.
- Ortega, M. (2009). Comportamiento reológico de disoluciones acuosas de surfactantes comerciales no iónicos. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Parsa, J.B., Golmirzaei, M., Abbasi, M. (2014). Degradation of azo dye C.I. Acid Red 18 in aqueous solution by ozone-electrolysis process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20:689-694.
- Pascual, A., Llorca, I., Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science and Technology*, 18:529-S35.
- 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.
- Pelizzetti, E., Minero, C., Maurino, V., Hidaka, H., Serpone, N. (1993). Photocatalytic process for surfactant degradation. In D.F. Ollis, H. Al-Ekabi (Eds.), Photocatalytic purification and treatment of water and air (pp.261-273). Elsevier Science Publishers, New York.
- Pérez, A.A., Poznyak, T.I., Chairez, J.I. (2014). Effect of the interaction between dye and acetic acid on the decomposition of Basic Green 4 with additive by ozone. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 49:18-26.
- Pocostales, J.P., Álvarez, P., Beltrán, F.J. (2012). Kinetic modeling of granular activated carbon promoted ozonation of a food-processing secondary effluent. *Chemical Engineering Journal*, 183:395-401.
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater – A Review. *Science of the Total Environment*, 33:37-58.
- Qu, X., Zheng, J., Li, J. (2011). Removal of alcohol ethoxylates from real industrial wastewater using ozonation catalyzed by activated carbon. *2011 International Conference on Electronics, Communications and Control, ICECC 2011 – Proceedings*, 4440-4443.

Raj, C.B.C., Quen, H.L. (2005). Advanced oxidation process for wastewater treatment: optimization of UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process through statistical technique. *Chemical Engineering Science*, 60:5305-5311.

Real Decreto 168/1985. Real Decreto 168/1985, de 6 de febrero, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria sobre condiciones generales de almacenamiento frigorífico de alimentos y productos alimentarios.

Real Decreto 140/2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Real Decreto 865/2003. Real Decreto 865/2003, de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénicos-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

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 de la Comisión de 20 de junio de 2006 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre detergentes, con el fin de adaptar sus anexos III y VII. (DO L 168, 21.06.2006).

Reglamento CE nº 1272, (2008). Reglamento (CE) Nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de Diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas". (DO L 353, 31.12.2008).

Reglamento CE nº 1336, (2008). Reglamento (CE) Nº 1336/2008 del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 que modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 para adaptarlo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 354, 31.12.2008).

Reglamento CE nº 219, (2009). Reglamento (CE) Nº 219/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de marzo de 2009 por el que se adaptan a la Decisión 1999/468/CE del Consejo determinados actos sujetos al procedimiento establecido en el artículo 251 del Tratado, en lo que se refiere al procedimiento de reglamentación con control. (DO L 87, 31.03.2009).

Reglamento CE nº 551, (2009). Reglamento (CE) Nº 551/2009 de la Comisión de 25 de junio de 2009 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre detergentes, con el fin de adaptar sus anexos V y VI (excepción sobre un tensioactivo). (DO L 164, 26.06.2009).

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 el Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 235, 05.09.2009)

Reglamento UE nº 259, (2012). Reglamento (UE) Nº 259/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 14 de marzo de 2012 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 648/2004 en lo que se refiere al uso de fosfatos y otros compuestos de fósforo en detergentes para lavavajillas automáticos y para ropa destinados a los consumidores. (DO L 94, 30.03.2012)

- Resnik, G. O., Vishwanath, P., Pynn, M. A., Sitnik, J. M., Todd, J. J., Wu, J., Jarrell, K. A. (2010). Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1387-1397.
- Ribosa, I., García, M.T., Sánchez-Leal, J., González, J.J. (1993). *Photobacterium Phosphoreum* test data of non-ionic surfactants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 39(3-4): 273-241.
- Richterich, K., Steber, J. (2001). The time -window- an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. *Chemosphere*, 44:1649-1654.
- Riebel, A.H., Erikson, R.E., Abshire, C.J., Bailey, P.S. (1960). Ozonation of carbon-nitrogen double bonds I. Nucleophilic attack of ozone. *Journal of the American Chemical Society*, 82:1801-1807.
- Rivas, J., Encinas, A., Beltrán, F., Graham, N. (2011). Application of advanced oxidation processes to doxycycline and norfloxacin removal from water. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 46:944-941.
- Rivas, J., Beltrán, F., Encinas, A. (2012). Removal of emergent contaminants: Integration of ozone and photocatalysis. *Journal of Environmental Management*, 100:10-15.
- Rivera-Utrilla, J., Bautista-Toledo, M.I., Sánchez-Polo, M., Méndez-Díaz, J.D. (2012). Removal of surfactant dodecylbenzenesulfonate by consecutive use of ozonation and biodegradation. *Engineering in Life Sciences*, 12:113-116.
- Roberts, D.W. (1991). QSAR issues in aquatic toxicity of surfactants. *Science of the Total Environment*, 109-110: 557-568.
- Roberts, J., Marshall, S.J., Roberts, D. (2007). Aquatic toxicity of ethoxylated and propoxylated alcohols to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26:68-72.
- Rodríguez, E.M., Fernández, G., Alvarez, P.M., Beltrán, F.J. (2012). TiO<sub>2</sub> and Fe (III) photocatalytic ozonation processes of a mixture of emergent contaminants of water. *Water Research*, 46:152-166.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Mezcuca, M., Hernando, M.D., Letón, P., García-Calvo, E., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2008). Removal of pharmaceuticals and kinetics of mineralization by O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a biotreated municipal wastewater", *Water Research*, 42:3719-3728.
- Rosen, M.J., Kunjappu, J.T. (2012). Surfactants and interfacial phenomena. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.
- Rust, D. (2008). Surfactants: a market opportunity study update. OmniTech International Ltd., Midland.
- Sanches, S., Barreto, M., Pereira, V.J. (2010). Direct water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advanced oxidation. *Water Research*, 44:1809-1818.
- Sánchez-Leal, J. (1995). Aspectos ecológicos de los detergentes. GPE Colección temas medioambientales. Gestió i Promoció Editorial, S.A. Barcelona.

- Sandbacka, M., Christianson, I., Isomaa, B. (2000). The Acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and Fish – A comparative Study. *Toxicology in Vitro*, 14: 61-68.
- Shvadchina, Y., Vakulenko, V., Alekseenko, E., Sova, A. (2013). Evaluation of efficacy of anionic surfactant degradation in the presence of concomitant impurities of natural waters. *Journal of Chemistry*, Article number 978764.
- Scott, M.J., Malcolm, N.J. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235-251.
- Sharma, S., Buddhdev, J., Patel, M., Ruparelia, J.P. (2013). Studies on degradation of reactive red 135 dye in wastewater using ozone. *Procedia Engineering*, 51:451-455.
- Snyder, S.A., Kelly, K.L., Grange, A.H., Sovocool, G.W., Snyder, E.M., Giesy, J.P. (2001). Pharmaceuticals and personal care products in the waters of Lake Mead, Nevada. In C.G. Daughton and T.L. Jones-Lepp, Eds., *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Washington, DC: *American Chemical Society*, 116-140.
- Snyder, S.A., Westerhoff, P., Yoon, Y., Sedlak, D.L. (2003). Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: Implications for the water industry. *Environmental Engineering Science*, 20:449-469.
- Sibila, M.A. (2008). 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.
- Solans, C., Pinazo, A., Caldero, G., Infante, M. (2001). Highly concentrated emulsions as novel reaction media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 176(1): 101-108.
- Stahelin, J., Hoigné, J. (1982). Descomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environmental Science & Technology*, 16(10):676-681.
- Steber, J., Guhl, W., Steker, N., Schröder, F. (1995). Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*, 32:515-521.
- Struijs, J., Stoltenkamp, J. (1994). Testing surfactants for ultimate biodegradability. *Chemosphere*, 28(8):1503-1523.
- Susmi, T.S., Rebello, S., Jisha, M.S., Sherief, P.M. (2010). Toxic effects of sodium dodecyl sulfate on grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Fishery Technology*, 47:157-162
- Tehrani, A., Nikkar, H., Menger, F., Holmberg, K. (2012). Degradation of two persistent surfactants by UV-enhanced ozonation. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15:59:66.
- Teixeira, C.P., Jardim, W.F. (2004). Processos oxidativos avançados conceitos teóricos. Caderno temático. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Torres, J.A. (2012). Sulfonation/sulfation processing technology for anionic surfactant manufacture advances in chemical engineering. In Z. Nawaz (Ed.) *In Tech*, Rijeka.

- Tu, M., Callie, H., Randall, J. (2003). Adjuvants. In M. Tu, H. Callie, J. Randall (Eds.), *Weed control methods handbook. Tools & Techniques for use in natural areas. The nature conservancy (172-196)*. All U.S. Government Documents, Utah.
- UNE 55523:1990. Norma UNE 55523:1990. Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos aniónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE 55844:1991. Norma UNE 55844:1991. Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE 400-201:1994. Norma UNE 400-201:1994. Generadores de ozono. Tratamiento de Aire. Seguridad Química.
- UNE-EN-ISO 862:1996. Norma UNE-EN-ISO 862:1996. Agentes de superficie. Vocabulario.
- UNE-EN 1278:2010. Norma UNE-EN 1278:2010. Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Ozono.
- Ungar, W.C., Jonas, K., Schwammlein, O., Leitzke. (1997). Selective degradation of surfactants with ozone. Regional Conference on Ozone, UV Light, *AOP in Water Treatment*, Amsterdam, p. 29-56.
- Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. (1996). *Química orgánica*. Omega, Barcelona.
- Wong, D.C.L., Dorn, P.B., Chai, E.Y. (1997). Acute toxicity and structure-activity relationships of nine alcohol ethoxylate surfactants to fathead minnow and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1970-1976.
- Yeber, M.C, Rodríguez, J., Freer, J., Baeza, J., Durán, N., Mansilla, H.D. (1999). Advanced oxidation of pulp mill bleaching wastewater. *Chemosphere*, 39:1679-1688.
- Ying, G.G. (2006). Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32:417-431.
- Xiao, J., Sivars, U., Tjerneld, F. (2000). Phase behavior and protein partitioning in aqueous two-phase systems of cationic-anionic surfactants mixture. *Journal of Chromatography B*, 743(1-2):327-338.
- Zhao, W., Liu, F., Yang, Y., Tan, M., Zhao, D. (2011). Ozonation of cationic red X-GRL in aqueous solution: kinetics and modelling. *Journal of Hazardous Materials*, 187:526-533.



## Capítulo 2

# Objetivos

Debido a las implicaciones ambientales derivadas de la presencia de los tensioactivos en los sistemas acuáticos y los problemas que conlleva su eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales, en esta Tesis se plantean unos objetivos generales que son: el estudio del comportamiento ambiental de los tensioactivos en los sistemas acuáticos, el estudio de los procesos de ozonización en la eliminación de tensioactivos, y cómo dichos procesos afectan a su biodegradabilidad y toxicidad. Para el cumplimiento de estos objetivos generales se plantean una serie de objetivos específicos:

1. Estudio de la influencia de la concentración inicial de tensioactivo en la biodegradación.
2. Análisis de la influencia de la estructura del tensioactivo sobre la biodegradación.
3. Determinación de la biodegradabilidad para diferentes tensioactivos aniónicos y no iónicos, y establecimiento de los criterios necesarios para el cumplimiento de la legislación vigente, así como para futuras decisiones sobre su inclusión en las formulaciones detergentes desde el punto de vista medioambiental.
4. Estudio de la cinética de biodegradación para tensioactivos alquilpoliglucósidos.
5. Análisis comparativo de los diferentes ensayos de biodegradación aerobia para determinar cuáles resultan más adecuados en el estudio de la biodegradación de tensioactivos.
6. Determinación de los valores de toxicidad para los tensioactivos mediante ensayos de toxicidad con tres especies diferentes: bacterias *Vibrio fischeri*, microcrustáceos *Daphnia magna* y microalgas *Selenastrum capricornutum*, y determinación de qué especie se ve más afectada por los efectos tóxicos de los tensioactivos.



7. Análisis de la influencia de la estructura del tensioactivo en su toxicidad.
8. Comparación de los valores de toxicidad obtenidos entre las distintas familias y con el tensioactivo de referencia lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), para tener en cuenta en futuras decisiones sobre su inclusión en formulaciones detergentes desde el punto de vista medioambiental.
9. Análisis de la toxicidad de mezclas de tensioactivos, y estudio de los efectos sinérgicos que puedan producirse.
10. Estudio de la influencia de los procesos de ozonización sobre la biodegradación de los tensioactivos.
11. Estudio de la cinética de degradación de tensioactivos en los procesos de ozonización.
12. Estudio de la influencia de los procesos de ozonización en la toxicidad de los tensioactivos.

# Capítulo 3

## Detalles Experimentales

### 3.1 TENSIOACTIVOS UTILIZADOS

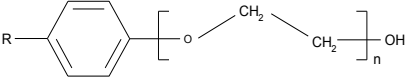
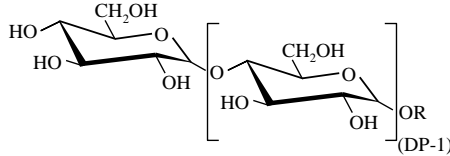
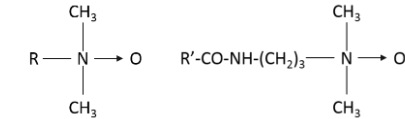
En este trabajo se han ensayado diferentes tipos de tensioactivos aniónicos y no iónicos con objeto de estudiar la influencia del carácter del grupo hidrófilo sobre la biodegradabilidad, toxicidad y degradación mediante métodos de oxidación avanzada con ozono. Así mismo, se han estudiado varias familias de tensioactivos con distintas estructuras moleculares, diferentes longitudes de cadena alquílica y/o grado de etoxilación con el mismo fin. En la Tabla III.1 se muestran las principales características de los tensioactivos utilizados.

#### **Aniónicos:**

Los **lineal alquilbenceno sulfonatos (LAS)** suponen el tensioactivo aniónico más utilizado mundialmente. Han sido ampliamente utilizados durante más de 30 años y su consumo en Europa se estima en 430.000 toneladas al año (HERA, 2013). Se encuentran en la mayoría de productos de limpieza y formulaciones detergentes actuales tales como detergentes en polvo, detergentes líquidos, lavavajillas y todo tipo de limpiadores. Este tensioactivo fue suministrado por Petresa S.A (Madrid, España).

La creciente preocupación sobre la biodegradabilidad y toxicidad de estos compuestos ha promovido el desarrollo de nuevos tensioactivos con mejor comportamiento ambiental (Yu, 2008). Entre ellos se encuentran los **derivados de ácidos éter carboxílicos (EC)** que se caracterizan porque mejoran las propiedades espumantes y reducen los niveles de irritación, por eso son empleados como co-tensioactivos en formulaciones detergentes que van a estar en contacto con la piel (Jurado, 2011; Jurado, 2012). Fueron suministrados por KAO Corporation S.A (Tokyo, Japón).

Tabla III.1.- Descripción de los tensioactivos utilizados

Aniónicos					
Tensioactivo		Estructura		% Materia Activa <sup>a</sup>	CMC, mg/L <sup>b</sup>
LAS-R <sub>11-14</sub>	Lineal alquilbenceno sulfonato	R-(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	R:11-14	-	25.5
EC-R <sub>4-8</sub> E <sub>1-8</sub>			R:4-8; E:1-8	87	1442.3
EC-R <sub>6-8</sub> E <sub>3-8</sub>			R:6-8; E:3-8	89	563.4
EC-R <sub>8</sub> E <sub>5</sub>	Ácido alquil éter carboxílico	R-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> O) <sub>E</sub> -O-CH <sub>2</sub> -COO-X	R:8; E:5	89	102.5
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>			R:8; E:8	89	243.4
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>			R:12-14; E:3	94	33.2
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>			R:12-14; E:10	94	69.0
No Iónicos					
Tensioactivo		Estructura		% Materia Activa <sup>a</sup>	CMC, mg/L <sup>b</sup>
NPOE	Nonilfenol polietoxilado		R:9; E:9.5	-	34.0
FAE-R <sub>10</sub> E <sub>3</sub>			R:10; E:3	99.6	13.53
FAE-R <sub>10</sub> E <sub>6</sub>			R:10; E:6	100	191
FAE-R <sub>12-14</sub> E <sub>4</sub>	Alcohol graso etoxilado	R(-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ) <sub>E</sub> -OH	R:12 (70%) -14 (30%); E:4	-	-
FAE-R <sub>12-14</sub> E <sub>11</sub>			R:12 (70%) -14 (30%); E:11	99.7	16.7
FAE-R <sub>16-18</sub> E <sub>6</sub>			R:16-18; E:6	99.2	-
FAE-R <sub>16-18</sub> E <sub>11</sub>			R:16-18; E:11	100	25.0
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	Alquilpoliglucósido		R:8-10; DP:1.4	63.0	1012
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>			R:8-14; DP:1.3	49.6	153
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>			R:12-14; DP:1.5	54.4	28.9
AO-R <sub>12</sub>	Óxido de Amina		R:12	30	474.3
AO-R <sub>14</sub>			R:14	30	107.7
AO-Cocoamido			AO-R <sub>14</sub> y AO-R <sub>12</sub> AO-Cocoamido	R' = C12	30

R: longitud de la cadena alquílica; E: grado de etoxilación; DP: n° medio de moléculas de glucosa por radical alquílico; X: H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>; R'-CO: (Cadena de Coconut).

<sup>a</sup> Dato suministrado por el fabricante.

<sup>b</sup> Concentración Micelar Crítica medida a 25°C para el tensioactivo comercial sin secar.

**No Iónicos:**

Los **nonilfenol polietoxilados** (NPEO) han sido ampliamente utilizados durante más de 40 años en diferentes aplicaciones y sectores industriales. Tradicionalmente se han empleado en formulaciones detergentes, constituyendo la materia activa de los mismos debido a sus propiedades tensioactivas. Debido a su resistencia a la biodegradación a bajas temperaturas, y la generación de algunos metabolitos persistentes durante el proceso de degradación, los cuales pueden ser más tóxicos que el compuesto original (Maguire, 1999), el uso de los NPEOs ha sido prohibido en las formulaciones domésticas en algunos países de la Unión Europea (Alemania, España y Reino Unido), así como en Suiza y Canadá (Soares, 2006).

Entre los tensioactivos no iónicos los **alcoholes grasos etoxilados (FAE)** representan una de las familias más utilizadas. Los alcoholes grasos comerciales generalmente consisten en una mezcla de varios homólogos de distinta longitud de cadena y grado de etoxilación. Son mundialmente utilizados en detergentes domésticos y comerciales, limpiahogares y productos cosméticos.

Los **alquilpoliglucósidos (APG)** son un tipo de tensioactivos preparados a partir de materias primas renovables, almidón/azúcar y aceites vegetales. Su creciente uso es debido a sus excelentes propiedades espumantes, así como el efecto de sinergia que presentan con otros tensioactivos, esto les hace propicios para su uso en lavavajillas, detergentes y otros productos de limpieza (Jurado, 2012). Además su buena tolerancia en la piel les hace adecuados para el uso en productos de cuidado personal (Kunh, 2004).

Los **óxidos de amina (AO)** son un tipo particular de tensioactivos no iónicos que presentan comportamiento catiónico en solución ácida y pueden ser ionizados dependiendo del pH del medio. Presentan buenas propiedades espumantes y son compatibles con la piel (García, 2007; Burnet, 2008). Su consumo se estima en 14,000 toneladas por año en Europa occidental (Merrettig-Bruns, 2003). Son ampliamente utilizados en detergentes, cosmética, suavizantes y acondicionadores de cabello (Gottschalck, 2006). Se usan junto con otros tensioactivos debido a que son compatibles con tensioactivos aniónicos y confieren propiedades sinérgicas a las formulaciones detergentes (Cross, 1994; Domingo, 1995).

EL nonilfenol polietoxilado fue adquirido de Tokyo Chemical Industry Co. (Tokio, Japón), los alcoholes grasos etoxilados y óxidos de amina fueron suministrados por KAO Corporation S.A (Tokyo, Japón), mientras que los alquilpoliglucósidos fueron suministrados por Henkel-Cognis (Düsseldorf, Alemania) a través de Sigma-Aldrich.

## 3.2 DETERMINACIÓN DE LA CMC MEDIANTE MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL

La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración mínima de tensioactivo a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución, es un punto definido con precisión para cada compuesto y se puede conocer mediante diferentes técnicas instrumentales tales como medidas de la tensión superficial, conductividad, resonancia magnética nuclear, etc.

### 3.2.1 FUNDAMENTO

Los tensioactivos disminuyen la tensión superficial del agua en concentraciones por debajo de la concentración en la que el tensioactivo ha cubierto la totalidad de la superficie.

Por encima de esta concentración las moléculas se agrupan en micelas y esta concentración se conoce como CMC. A partir de la CMC la tensión superficial permanece constante. Para determinar la CMC se realizan medidas de la tensión superficial en un rango amplio de concentraciones de tensioactivo y cuando la tensión superficial permanece constante es un indicador de que se ha alcanzado la CMC.

Para la medida de la tensión superficial se pueden utilizar diferentes técnicas basadas en la medición de fuerza, de presión o medidas geométricas o de deformación de una interfase en un campo gravitacional. En este caso se ha utilizado el método del plato (Wilhelmy) basado en la medida de la fuerza hacia abajo que sobre una placa lisa ejerce la superficie o interfase de una disolución cuando esta placa toca exactamente esa superficie o interfase.

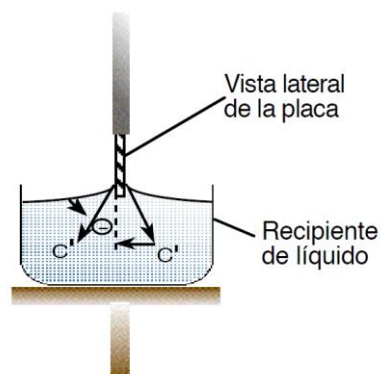


Figura III.1.- Esquema del método del plato para la medición de la tensión superficial (Salager, 2005)

La fuerza ejercida es:

$$P = m \cdot g = 2(l + d) \cdot \gamma$$

Ecuación III.1

donde  $l$  es la longitud de la placa y  $d$  su espesor.

La placa, en general, muy fina se construye de platino y su geometría se conoce exactamente. La medida de la fuerza se hace uniendo la placa a una balanza sensible de torsión, con alguna clase de dispositivo de elevación bien para bajar la placa hacia la superficie del líquido o elevar la superficie del líquido hacia la placa. Es un método sencillo y de precisión moderada (0.1 dina/cm).

### 3.2.2 EQUIPOS

El equipo utilizado es el tensiómetro KRÜSS TENSIO METER K11 de anillo y placa acoplado a un baño termostatzado.

### 3.2.3 PROCEDIMIENTO

1. Antes de medir, es muy importante lavar todo el material que se vaya a utilizar tal y como se describe en el apartado "3.7 Protocolo de limpieza". La placa se quema en un mechero Bunsen hasta ponerla al rojo vivo para eliminar cualquier impureza orgánica.
2. Se enciende el equipo auxiliar de termostatzado y se selecciona la temperatura de consigna deseada.
3. Se vierte la muestra a la cual se quiere determinar su tensión superficial en el vaso y se coloca en tensiómetro.

4. Se selecciona el método de medida "Plate", el número de medidas, 30, y el intervalo entre medidas 0.5 s.
5. Se ajusta la placa, con ayuda de la ruleta de posición, en torno a 1mm por encima de la interfase y se ejecuta la orden de medida en el tensiómetro.
6. Trascurridos unos 20 segundos, se muestra en la interfaz gráfica el valor de la tensión superficial con su desviación estándar y la temperatura a la que se ha medido.
7. Al representar los datos de tensión superficial obtenidos para las diferentes concentraciones, la CMC puede obtenerse de la intersección de las rectas de las pendientes de la parte inicial y final de la curva obtenida tal y como se muestra en la Figura III.2.

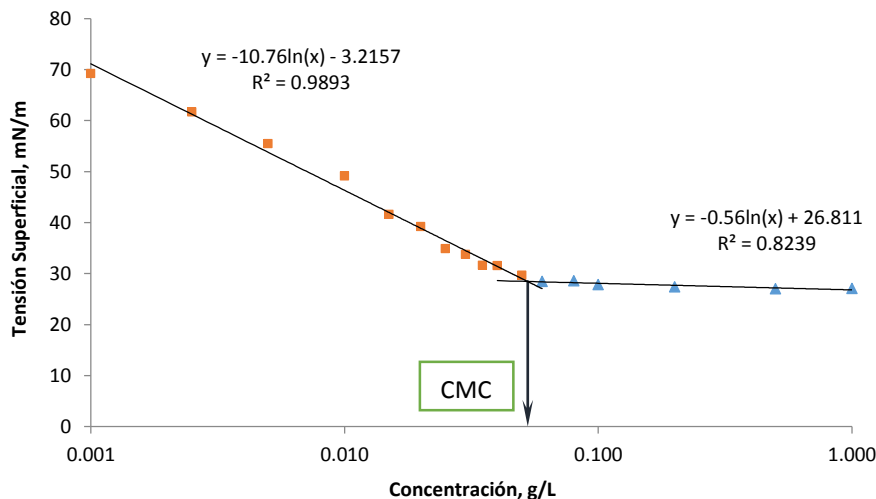


Figura III.2.- Determinación de CMC para EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> +EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> mediante medidas de tensión superficial

### 3.3 MÉTODOS DE ENSAYO DE LA BIODEGRADABILIDAD

#### 3.3.1 ENSAYO ESTÁTICO

Se utiliza este ensayo para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos. Viene recogido en las Normas [UNE 55523:1990](#) (UNE 55523:1990) y [UNE 55844:1991](#) (UNE 55844:1991); "Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos aniónicos y no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes".

El método especificado en esta norma y sus anexos es el aprobado por la OCDE (OCDE, 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 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).

##### 3.3.1.1. 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 28 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, 2007).

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 lineal alquilbenceno sulfonato (LAS-R<sub>11-14</sub>). 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.

### 3.3.1.2. 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 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , P.A.) de Panreac.
  - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 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 ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 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 ( $\text{CaCl}_2$ , 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<sup>®</sup> 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 derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (EC), los cuales se encuentran en forma ácida, se ajusta el pH a 7 mediante NaOH 1M y/o HCl 1N.

→ 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.

### 3.3.1.3. 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.

#### **3.3.1.4. 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 3.7) 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.

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

El sistema de agitación se dispone en una estancia oscura y termostatizada a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  equipada con sistema de calefacción 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 de la concentración de tensioactivo, medida del carbono orgánico total (TOC) y /o del número de unidades formadoras de colonias (UFC).

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

#### 3.3.1.6. SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN

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

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.

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

#### 3.3.2 ENSAYO DINÁMICO

Se utiliza este ensayo para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos. Viene recogido en las Normas [UNE 55523:1990](#) (UNE 55523:1990) y [UNE 55844:1991](#) (UNE 55844:1991); “Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos aniónicos y no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes”.

El método especificado en esta norma y sus anexos es el aprobado por la OCDE (OCDE, 1993b). El [Reglamento \(CE\) n° 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 n° 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).

Se realiza este ensayo para los tensioactivos que no se biodegradan de forma satisfactoria durante el ensayo estático (de selección), se comprueba así su biodegradabilidad en condiciones próximas a las reales.

##### 3.3.2.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Consiste en inocular una pequeña cantidad de microorganismos, procedentes del efluente secundario de una planta de depuración que trabaja preferentemente con aguas residuales domésticas, en un agua residual sintética que contiene el tensioactivo cuya biodegradabilidad ha de determinarse.

El proceso de biodegradación se realiza en una pequeña planta de depuración (Figura III.3), a escala de laboratorio, para tratamiento con fangos activos, en la cual se introduce el agua residual sintética con un caudal de 1 L/h. El ensayo se efectúa a temperatura ambiente, la cual se mantiene estable entre 18 y 25°C.

El porcentaje de biodegradación de los tensioactivos ensayados se determina diariamente a partir de las concentraciones de Carbono Orgánico Disuelto (COD) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) en el agua residual sintética que entra en la planta y en el efluente acumulado en el depósito de recogida durante las últimas 24 horas.

### 3.3.2.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

#### ▭ Agua residual sintética

Se prepara disolviendo en 1 de agua corriente los siguientes compuestos:

- 8 g peptona bacteriológica
- 5.5 g extracto de carne
- 1.5 g urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ )
- 0.35 g cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ )
- 0.2 g cloruro cálcico dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- 0.1 g sulfato magnésico heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 1.4 g monohidrógenofosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Calentar hasta ebullición y diluir en 50 litros de agua corriente.

#### ▭ Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo no iónico de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada. La disolución de concentración de tensioactivo requerida se obtiene por dilución de la disolución madre en agua desionizada hasta obtener la concentración de partida del ensayo, que será de 10 mg/L  $\pm$  1 mg/L.

Esta cantidad inicial de tensioactivo que se alimenta a la planta corresponde aproximadamente a las concentraciones detectadas en los sistemas de alimentación de las EDARs (Schöberl, 1991).

#### ▭ Inóculo

El inóculo debe proceder de un efluente secundario biológico de buena calidad, recién cogido de una planta de tratamiento de aguas residuales que opere predominantemente con vertidos de origen doméstico. Durante el tiempo que transcurra entre la toma del efluente y su utilización, éste debe mantenerse en condiciones aerobias.

### 3.3.2.3 EQUIPOS

#### Equipo para el ensayo dinámico de biodegradabilidad

Está formado por una planta de depuración a escala de laboratorio a base de fangos activos. Su esquema simplificado se representa en la Figura III.3.

Se utilizó un equipo, de dimensiones normalizadas según la [NORMA UNE 55844:1991](#) (UNE 55-844-91), proporcionado por AFORA.

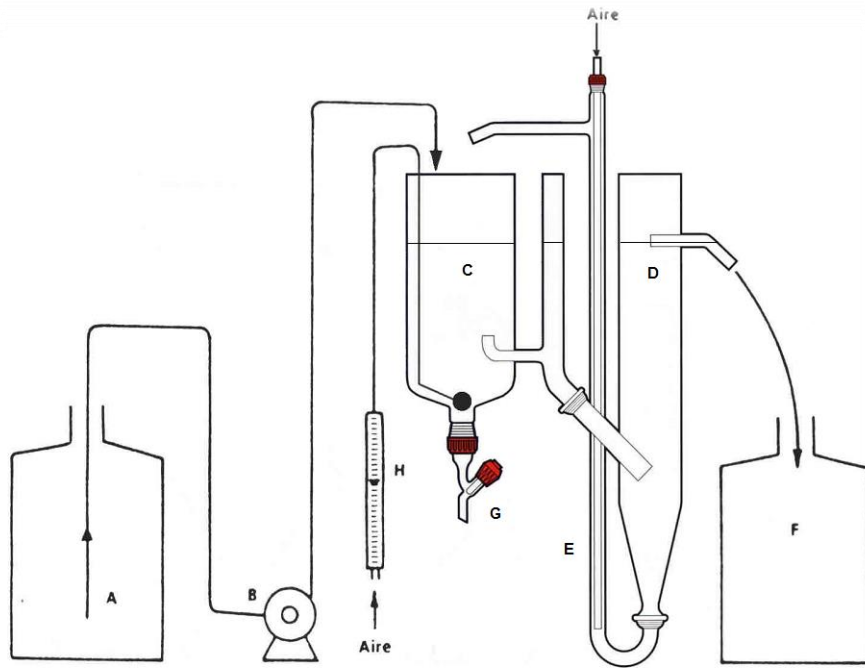


Figura III.3.- Equipo utilizado en el ensayo dinámico de biodegradación

El equipo consta de:

- Recipiente de almacenamiento, de vidrio o de un plástico adecuado, con 24 L de capacidad mínima para almacenar el agua residual sintética.
- Bomba dosificadora, que debe dar un caudal constante del agua residual sintética contenida en el recipiente A.
- Recipiente de aireación, que contiene unos 3 L de la suspensión del lodo activo en agua residual sintética durante una operación normal de biodegradación.
- Decantador, de 1.5 L de capacidad.
- Tubo de inyección de aire comprimido, para recircular el lodo activo decantado hacia el recipiente de aireación C.
- Colector de vidrio o de un plástico adecuado, con 24 L de capacidad mínima para recoger el efluente tratado.
- Aireador, formado por un disco de vidrio sinterizado, destinado a distribuir el aire en la suspensión que contiene el recipiente C. El aireador se sitúa en el fondo de este recipiente.
- Medidor de caudal de aire que, procedente de una bomba, se inyecta a través del aireador C.

### 3.3.2.4 PUESTA EN MARCHA DE LA INSTALACIÓN

Para la puesta en marcha de la instalación se inocula el agua de alimentación con agua residual procedente del clarificador secundario de la estación depuradora de aguas residuales urbanas “Camino de Purchil” de Granada (EDAR “EMASAGRA- Camino de Purchil”) a razón de 200 mL/L de agua residual sintética.

Una vez que el recipiente de almacenamiento contiene el agua residual sintética inoculada, por medio de la bomba dosificadora, se llena el recipiente de aireación y el decantador. La altura del decantador debe ser la necesaria para que el volumen de agua contenido en el recipiente de aireación sea de 3 L.

Se pone en funcionamiento la entrada de aire a través del difusor cerámico (disco aireador) y al tubo de inyección mediante los compresores de aire. El caudal de recirculación debe ser del 100 % (medido respecto del de alimentación). El agua residual sintética debe circular en el interior del recipiente de aireación con un caudal de 1 L/h, lo que equivale a trabajar con un tiempo medio de residencia de 3 horas.

El compresor de aire conectado al difusor cerámico proporciona, por un lado, la cantidad de aire necesario para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima de los 2 mg/L, y por otro, la energía mecánica necesaria para mantener los fangos activados en suspensión y mezclados de forma homogénea.

La instalación se mantiene funcionando hasta que se alcanza una concentración de fango en el reactor de  $3 \pm 0.5$  g/L, llegado este punto se extrae diariamente la cantidad necesaria para mantener la concentración de fango en el valor deseado.

La duración del período inicial de adaptación no debe ser superior a seis semanas.

Una vez alcanzadas las condiciones de operación del reactor, se incorpora al agua de alimentación el tensioactivo cuya biodegradabilidad se desee medir, a una concentración de  $10 \text{ mg/L} \pm 1 \text{ mg/L}$ .

### **3.3.2.5 PROCEDIMIENTO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN**

El recipiente de almacenamiento debe contener, durante todo el ensayo, un volumen de agua residual sintética suficiente para asegurar la alimentación regular al recipiente de aireación y con un caudal de 1 L/h.

En el recipiente de aireación, ésta se regula de forma que los sólidos allí contenidos se mantengan constantemente en suspensión. El contenido en oxígeno disuelto del medio acuoso debe ser de 2 mg/L como mínimo. La temperatura del ensayo debe mantenerse, de una forma estable entre 18°C y 25°C.

El extremo inferior del tubo de inyección de aire comprimido debe situarse de forma que el lodo activo se recicle continua y regularmente desde el decantador hasta el recipiente de aireación. El lodo que se acumule en la parte superior del recipiente de aireación, en el fondo del decantador, o en otro lugar del circuito de desplazamiento del mismo, debe pasarse a la suspensión, al menos una vez al día, por medio de un escobillón u otro utensilio adecuado.

La formación de espuma debe evitarse en lo posible por medios adecuados, en cualquier caso no se utilizan antiespumantes que inhiban el fango activo o que contengan productos capaces de comportarse como tensioactivos.

El efluente del decantador se va recogiendo en el depósito colector. Cada 24 horas se mezcla bien su contenido, se toma un volumen del mismo que sea suficiente para determinar, por duplicado, la concentración de tensioactivo, se elimina el resto del efluente y se limpia cuidadosamente el colector con agua y sin utilizar ningún agente tensioactivo antes de iniciar una nueva recogida de efluente.

### **3.3.2.6 SEGUIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN**

El seguimiento del ensayo se realiza mediante la medida diaria de una serie de parámetros de control, como son la temperatura, pH, sólidos en suspensión, actividad de la deshidrogenasa (DHA) y tasa de respiración específica (SOUR).

La comprobación de la eficacia del proceso se realiza determinando diariamente la diferencia entre los valores de la DQO, o entre los valores del COD (carbono orgánico disuelto), correspondientes al agua residual sintética inicial y al filtrado del efluente contenido en el colector.

Los porcentajes de eficacia de la biodegradación obtenidos se representan gráficamente de la forma indicada en la Figura III.4 donde se observan los resultados que pueden obtenerse en función del tiempo, dependiendo de la biodegradabilidad del tensioactivo ensayado.

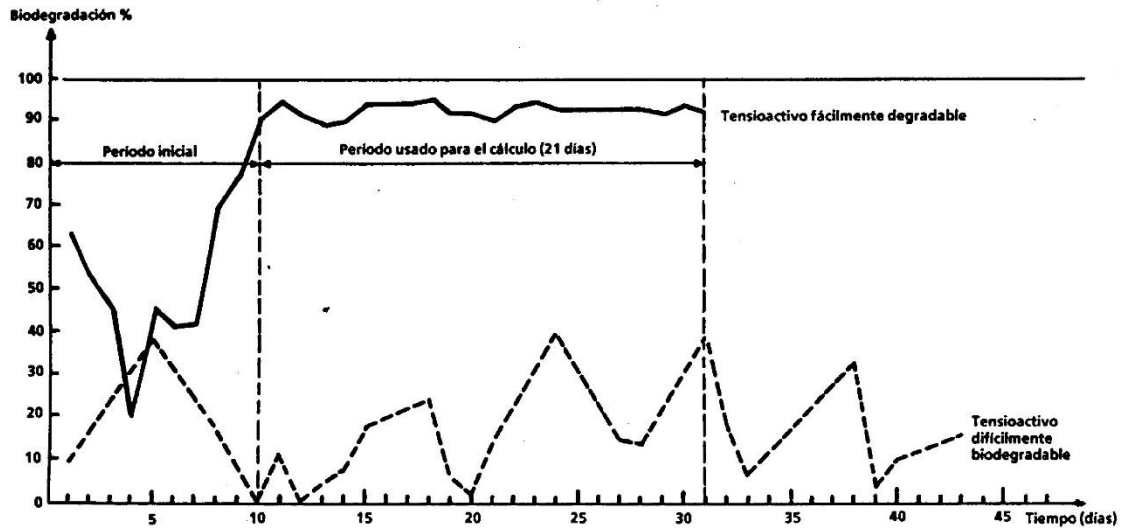


Figura III.4.- Perfil típico de biodegradación para el ensayo dinámico de biodegradación

La reducción en la DQO, o en el COD, debe igualarse cuando se obtenga un grado de biodegradación regular diario, es decir, una vez terminado el período inicial de biodegradación.

La materia seca en el lodo activo contenido en el recipiente de aireación debe determinarse, en gramos por litro, dos veces por semana. Si hay más de 3 g/L, el exceso de lodo activo debe retirarse purgando en el decantador la cantidad de fango que sea necesario.

### 3.3.3 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.

#### 3.3.3.1. 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 CO<sub>2</sub>.

Si dichos procesos se desarrollan en un sistema cerrado y el CO<sub>2</sub> 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.

### 3.3.3.2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- ⌞ Hidróxido sódico (NaOH, P.R.S. de Panreac). Se utiliza para la absorción del CO<sub>2</sub>.
- ⌞ 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, P.A.) de Panreac.
  - 21.75 g de monohidrógenofosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, P.A.) de Panreac.
  - 33.4 g de monohidrógenofosfato disódico dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, P.R.S.) de Panreac.
  - 1.7 g de cloruro amónico (NH<sub>4</sub>Cl, P.R.S.) de Panreac.
- B. Se disuelven en 1000 mL de agua 22.5 g de sulfato magnésico heptahidratado (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, P.R.S.) de Panreac.
- C. Se disuelven en 1000 mL de agua 27.5 g de cloruro cálcico anhidro (CaCl<sub>2</sub>, P.A.) de Panreac.
- D. Se disuelven en 1000 mL de agua 0.25 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>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 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 derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (EC), los cuales se encuentran en forma ácida, se ajusta el pH a 7 mediante NaOH 1M y/o HCl 1N.

### 3.3.3.3. 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<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub>, así como una cabeza enroscada directamente en la botella, la cual mide y almacena la información. La cabeza tiene un sensor que posee un 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<sub>2</sub> 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 termostatazada 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.

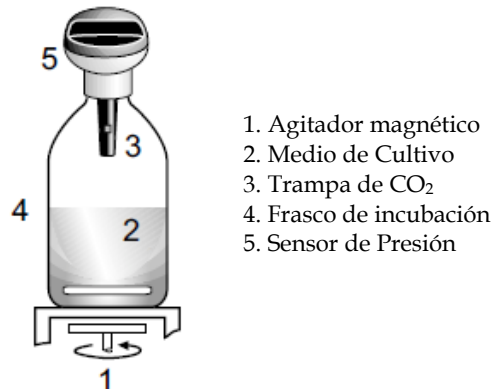


Figura III.5.- Representación esquemática del equipo respirométrico

### 3.3.3.4. 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 CO<sub>2</sub> 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 termostatazada a 25° C ± 1° C equipada con control de temperatura y en ausencia de luz.

### 3.3.3.5. 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):

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

Ecuación III. 2

donde:

M(O<sub>2</sub>): peso molecular del oxígeno.

R: constante de los gases.

T<sub>0</sub>: temperatura a 0°C.

T<sub>25</sub>: temperatura de incubación (25 °C).

V<sub>TOTAL</sub>: volumen de la botella.



V<sub>LÍQUIDO</sub>: volumen de líquido contenido en la botella.

$\alpha$ : coeficiente de absorción de Bunsen.

$\Delta p$ : 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.

### 3.3.4 ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN CON *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Se utiliza este ensayo con bacterias *Pseudomonas putida* para determinar la biodegradabilidad de tensioactivos aniónicos y no iónicos.

#### 3.3.4.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las bacterias *Pseudomonas* son un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. *Pseudomonas putida* es una de las cepas de mayor interés industrial entre las bacterias del género *Pseudomonas*, ya que unido a su potencial de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos, presenta la capacidad de colonizar el sistema radicular de plantas, formar biopelículas y de ser manejable desde el punto de vista genético.

En este ensayo se emplean bacterias *Pseudomonas putida* de la cepa CECT 324 adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España), un microorganismo modelo para el tratamiento biológico y el seguimiento de la biodegradación del tensioactivo por parte de dichas bacterias. Las bacterias se ponen en contacto con el tóxico en una disolución de nutrientes y utilizan el tensioactivo como fuente de carbono. Como resultado las bacterias degradan el tensioactivo llevándolo a su mineralización o transformándolo en otros productos intermedios. La biodegradación final del tensioactivo puede seguirse mediante medidas del carbono orgánico disuelto.

#### 3.3.4.2 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 desionizada (calidad Milli-Q<sup>®</sup> con resistividad de 18.2 M $\Omega$ .cm equivalente a la del agua pura) en cualquier caso exenta de sustancias tóxicas, especialmente de productos que contengan cobre.

↪ Bacterias *Pseudomonas putida* CECT 324: adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo en forma liofilizada. Conservadas antes de su reconstitución en oscuridad y a temperatura controlada 4-24°C, preferiblemente 18°C.

↪ Medio de cultivo líquido. (Ballesteros-Martín, 2010). Disolver en un 1L de agua desionizada lo siguiente:

- 1 g extracto de Buey
- 2 g extracto de Levadura
- 5 g peptona
- 5 g NaCl

Se ajusta el pH de la disolución a  $7.2 \pm 0.2$  con NaOH 1 M y/o HCl 1 N.

– Medio de cultivo sólido. (Ballesteros-Martín, 2010). Disolver en un 1L de agua desionizada lo siguiente:

- 1 g extracto de Buey
- 2 g extracto de Levadura
- 5 g peptona
- 5 g NaCl
- 15 g agar

Se ajusta el pH de la disolución a  $7.2 \pm 0.2$  con NaOH 1 M y/o HCl 1 N, y se vierte en placas Petri y tubos de cultivo en posición inclinada.

– Medio de compuestos inorgánicos. (Ballesteros-Martín, 2010). Diluir en 0.5 L de agua desionizada lo siguiente:

- 0.5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 0.5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

– Disolución de metales traza. (Shim, 2002). Diluir en 1 L de agua desionizada lo siguiente:

- 0.98 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0.8 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.2 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.2 g Ácido nitrilotriacético

– Disolución de tensioactivo a ensayar

Se prepara una disolución de tensioactivo de 1g/L (disolución madre) disolviendo éste en agua desionizada (calidad Milli-Q<sup>®</sup> con resistividad de 18.2 M $\Omega$ .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.

Todas las disoluciones preparadas, material de vidrio y tapones han de esterilizarse durante 30 min a 121°C para mantener las condiciones estériles durante el desarrollo del ensayo.

### 3.3.4.3. EQUIPOS

#### Agitador orbital

En los ensayos estáticos de biodegradación se utilizó el agitador orbital modelo OVAV, termostatzado con un baño de agua y capacidad para 30 matraces de 250 mL.

#### Autoclave

Utilizado para esterilizar el medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos así como el material necesario. Autoclave 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.

### 3.3.4.5 PROCEDIMIENTO

#### 3.3.4.5.1 Preparación del stock de *Pseudomonas putida*

La cepa suministrada por la CECT en forma liofilizada ha de rehidratarse para preparar el cultivo stock de bacterias que posteriormente se utilizará para inocular los matraces con el tóxico, para ello será necesario rehidratar el liófilo con 0.2-0.3 mL de medio líquido estéril hasta conseguir una suspensión de bacterias. A continuación esta suspensión se utiliza para inocular un medio sólido en placa Petri y el resto se transfiere a un medio líquido. La placa Petri inoculada ha de incubarse durante 24 horas a 30°C. Tras las 24 horas, una vez formadas las colonias, coger una colonia y cultivar en medio líquido en matraz Erlenmeyer de 25 mL, con 5 mL de medio de cultivo líquido.

#### 3.3.4.4.2 Preparación de las disoluciones a ensayar

En matraces Erlenmeyer de 250 mL añadir:

- 1) 50 mL de medio de compuestos inorgánicos.
- 2) 1 mL de medio de disolución de elementos traza.
- 3) La cantidad necesaria de disolución de tensioactivo para conseguir la concentración deseada en 100mL.
- 4) Ajustar el pH a  $7 \pm 0.2$  añadiendo NaOH 0.1M.
- 5) Inocular cada matraz con 200  $\mu$ L del stock de *P. putida*.
- 6) Completar con agua Milli-Q<sup>®</sup> hasta 100mL.
- 7) Incubar a 30° durante 72 horas con agitación orbital.

Se preparan varias concentraciones de tensioactivo para estudiar la influencia de la concentración sobre la biodegradabilidad y un matraz en ausencia de tensioactivo que servirá como blanco.

La viabilidad del inóculo se comprueba con 30  $\mu$ L de stock bacteriano en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL del medio de cultivo.

#### 3.3.4.4.3 Evaluación de la biodegradación

La evaluación de la biodegradación se realiza midiendo el Carbono Orgánico Disuelto (COD), que se realiza con el equipo analizador de carbono TOC-V CSH. Para ello se toma una muestra a tiempo 0 y a 72 horas para cada una de las concentraciones ensayadas incluyendo el blanco, se filtran utilizando filtros Millipore de 0.45 $\mu$ m y se mide el carbono orgánico disuelto (COD).

La eficiencia de la biodegradación del tensioactivo se calcula como el porcentaje dado por (Ballesteros-Martín, 2010):

$$E_f(\%) = \frac{COD_i - (COD_f - COD_m)}{COD_i} \cdot 100$$

Ecuación III.3

Donde:

COD<sub>i</sub>: Carbono orgánico disuelto al inicio

COD<sub>f</sub>: Carbono orgánico disuelto al final del ensayo

COD<sub>m</sub>: Es la concentración mínima de carbono orgánico que no puede ser metabolizada por las células, el valor se obtiene del ensayo en blanco en ausencia de tensioactivo.

### 3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

#### 3.4.1 ANÁLISIS DE TENSIOACTIVOS

##### 3.4.1.1 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 903:1994 (UNE EN 903:1994); "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 realiza 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. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de tensioactivo aniónico.

##### Reactivos y Disoluciones

Durante todo el análisis se utilizan reactivos de calidad analítica reconocida, y agua desionizada (calidad Milli-Q® con resistividad de 18.2 MΩ.cm equivalente a la del agua pura).

- ⊏ *Cloroformo* (CHCl<sub>3</sub>, P.A. de Panreac).
- ⊏ *Disolución de azul de metileno*, estabilizada a pH ligeramente ácido; se disuelven 0.1 g de azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>S.xH<sub>2</sub>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* (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 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 µl de tetraborato sódico 50 mM y pH 10.5, a continuación se añaden 100 µl 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. Mediante la correspondiente recta de calibración, dado el valor de absorbancia permite conocer la concentración del tensioactivo en la muestra.

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

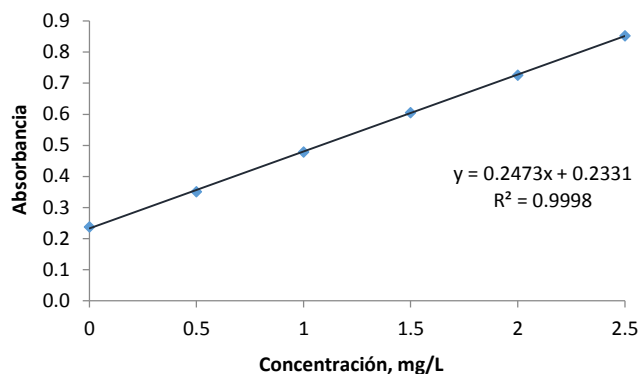


Figura III.6.- Recta de calibrado para el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno

### 3.4.1.2 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 desionizada (calidad Milli-Q<sup>®</sup> con resistividad de 18.2 MΩ.cm equivalente a la del agua pura).

- ⌞ *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.7 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>.

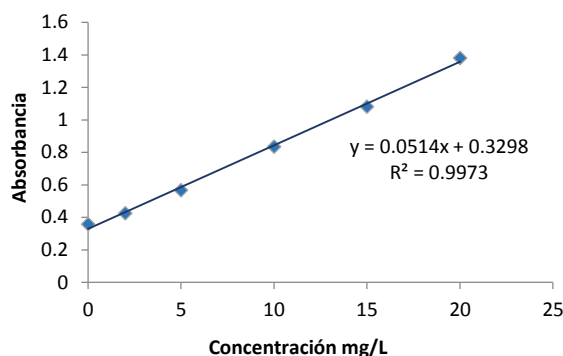


Figura III.7.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro

### 3.4.1.3. MÉTODO DE LA ANTRONA

Se trata de una modificación del método de la antrona propuesto por Buschmann y col. (Buschmann, 1995) para el análisis de carbohidratos y por tanto idóneo para el análisis de alquilpoliglucósidos.

#### Fundamento del método

La antrona forma productos coloreados de color verde cuando se calienta conjuntamente con los carbohidratos en una solución ácida. Bajo esas condiciones los alquilpoliglucósidos son hidrolizados a alcoholes grasos y carbohidratos, por tanto pueden ser determinados por el mismo método. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de tensioactivo.

#### Reactivos y disoluciones

Durante todo el análisis se utilizan reactivos de calidad analítica reconocida, y agua desionizada (calidad Milli-Q<sup>®</sup> con resistividad de 18.2 MΩ.cm equivalente a la del agua pura).

- *Solución de Antrona;* Se disuelven 1.4758g de reactivo de Antrona calidad P.A de Panreac sobre 100 mL de ácido sulfúrico concentrado de calidad P.A de Panreac Esta solución debe conservarse en frasco de vidrio color topacio y se renueva cada 8 días.
- *Solución madre patrón de alquilpoliglucósido de 1 g/L.*
- *Solución hija patrón de alquilpoliglucósido 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 622 nm de longitud de onda.

### Procedimiento

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

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

En la Figura III.8 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>.

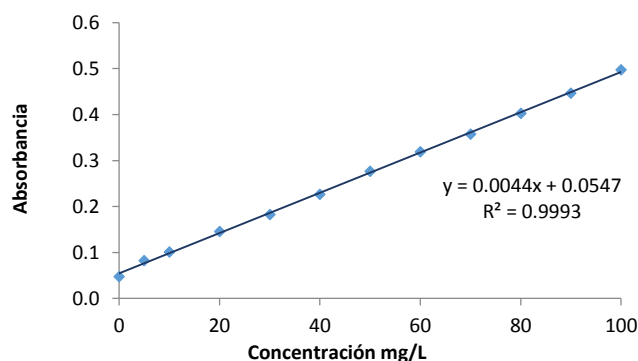


Figura III.8.- Recta de calibrado por el método de la antrona

### 3.4.1.4. 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 biodegradabilidad final y concentración residual de tensioactivo al finalizar 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.

## TOC = TC-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 CO<sub>2</sub>. 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 CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> disuelto, carbonato o bicarbonato, es transformado en CO<sub>2</sub> 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.

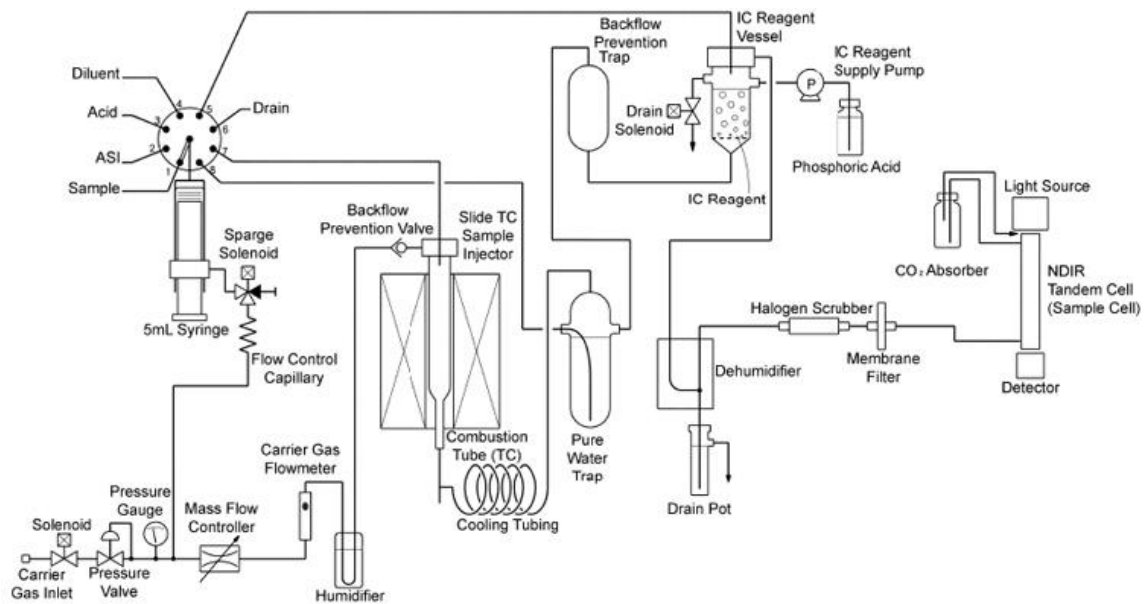


Figura III.9.- Diagrama de Flujo TOC

### 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<sub>2</sub>



- ⌞ 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.

**Tabla III.2.- Especificaciones Técnicas TOC-V CSH**

<b>TOC</b>	
<b>Modelo TOC</b>	V CSH
<b>Método de medida</b>	Combustión oxidativa catalítica/celda de infrarrojos no dispersiva
<b>Funcionamiento</b>	Independiente o controlado por PC
<b>Tipo de muestras</b>	Líquido (opcional sólido/gas)
<b>Tipo de medidas</b>	Carbono inorgánico, carbono orgánico total, carbono total
<b>Límite de detección</b>	50µg/L
<b>Gama de medición</b>	0-3000 mg/L
<b>Presión</b>	CV 1.5% máx.
<b>Tiempo de medida TC</b>	3 min
<b>Tiempo de medida IC</b>	3 min
<b>Tipo de inyección</b>	Inyección automática
<b>Volumen de inyección</b>	10-2000 µL
<b>Pretratamiento IC</b>	Tratamiento y rociado automático
<b>Dilución de la muestra</b>	Automática de 2 a 50 veces
<b>Gas de transporte</b>	Aire de alta pureza
<b>Presión del gas</b>	300-600 kPa
<b>Rango de temperatura ambiente</b>	5-35°C
<b>Alimentación eléctrica</b>	AC 100-127 ± 10%, Max. 800 VA AC 220-240 ± 10%, Max. 1200 VA
<b>Dimensiones</b>	(W)440x(D)560x(H)450 mm
<b>Peso</b>	40 kg aprox.
<b>AUTOMUESTREADOR</b>	
<b>Peso</b>	14 kg aprox.
<b>Tipo de viales</b>	24 mL
<b>Nº de viales</b>	93
<b>dimensiones</b>	(W)370x(D)540x(H)490 mm

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

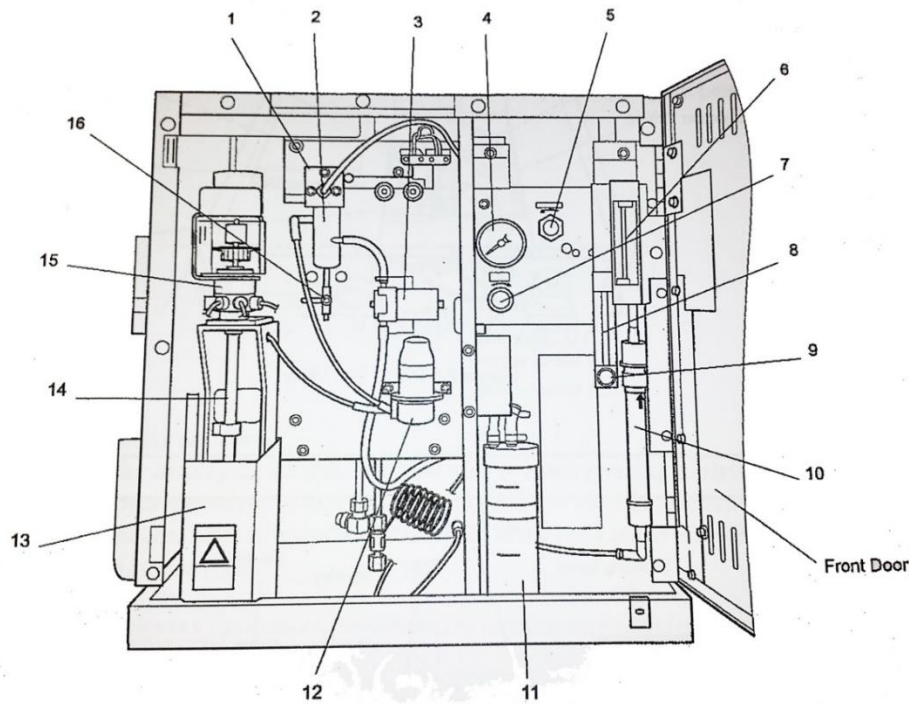


Figura III.10.- Vista interior del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu

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

### 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  $\mu\text{m}$  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 mediadas se obtienen los datos requeridos de TOC, IC o TC.

### **3.4.1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)**

Mediante cromatografía líquida de alta resolución se determinó la concentración de APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> para algunos ensayos.

#### **Fundamento**

Esta técnica permite separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

#### **Equipo**

Fue utilizado el equipo HPLC LC-10AD de Shimadzu con un sistema de fase inversa isocrático con columna Nucleosil 100-C18 de tamaño de partícula 5 µm (dimensiones 250 mm x 4.6 mm) y un detector de índice de refracción de fase continua acetonitrilo, con agua 75:25 v/v, caudal a 0.5 mL/min, temperatura 30 °C, y volumen de inyección 20 µL.

#### **Procedimiento**

No fue necesario ninguna preparación previa de las muestras. Después de la disolución en el eluyente, fueron filtradas a través de filtros Millipore 0.45 µm HVPL y directamente inyectadas en el sistema. Los monoglucósidos n-octyl β-D-glucopyranoside, n-decyl α-glucopyranoside, n-dodecyl α-D-maltoside, y n-nonyl β-D-glucopyranoside fueron usados con estándares en la identificación cromatográfica de los productos comerciales.

### **3.4.2 RECUENTO DE LA BIOMASA**

#### **3.4.2.1 FUNDAMENTO**

Las curvas de crecimiento son un método alternativo para evaluar el progreso de la biodegradación de tensioactivos cuando estos 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.

#### 3.4.2.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

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

#### 3.4.2.3 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 "Countermat Flash" de IUL instrument, que permite contar las UFC de forma automática.

#### 3.4.2.4 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 ClNa 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.

### 3.4.3 PARÁMETROS DE CONTROL

#### 3.4.3.1. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

Los sólidos en suspensión son los sólidos retenidos por un filtro de fibra de vidrio después de secado hasta pesada constante a 105 °C. Se utiliza el método de filtración para determinar el contenido de materias en suspensión en medios acuosos del ensayo dinámico de biodegradación.

##### Fundamento

Se filtra el agua y el peso de materias retenido por el filtro se determina por diferencia de pesada.

##### Aparatos y reactivos

- ⊏ *Dispositivo de filtración a vacío*; bomba de vacío, matraz kitasatos, adaptador y portafiltros de polipropileno.
- ⊏ *Probeta graduada* de 100 mL de polietileno o vidrio.
- ⊏ *Discos filtrantes de fibra de vidrio borosilicatado* de 47 mm de diámetro, tipo AP 40 de MILLIPORE ®.
- ⊏ *Estufa* de desecación regulable a 103-105 °C de SELECTA.
- ⊏ *Balanza* de 0.1 mg de precisión METTLER AE 260.

##### Procedimiento

En primer lugar se lavan los discos de filtración con agua destilada y se secan en la estufa a 105 °C hasta peso constante, la pesada se hace en una balanza de 0.1 mg de precisión.

Se coloca el filtro en el equipo de filtración y se vierte un volumen medido de muestra bien mezclada entre 10-100 mL. Se separa cuidadosamente el filtro del equipo. Se deja airear el filtro, se seca a 105 °C (una hora al menos), se deja enfriar en el desecador para equilibrar la temperatura y se vuelve a pesar con una precisión de 0.1 mg hasta peso constante.

##### Expresión de los resultados

El contenido en sólidos en suspensión, en mg/L del agua, viene determinado por la siguiente expresión:

$$[S.S] = \frac{(M_1 - M_0)}{V} \cdot 1000$$

Ecuación III.4

donde:

M<sub>0</sub>: Peso del disco filtrante en mg antes de su utilización.

M<sub>1</sub>: Peso del disco filtrante en mg después de su utilización.

V: Volumen de agua filtrada, en mL.

### 3.4.3.2. DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

#### Fundamento

La demanda química de oxígeno es la cantidad de oxígeno consumido por las materias existentes en el agua y oxidables en condiciones operatorias definidas, esto es; digestión a 150 °C con un exceso de dicromato potásico, en medio fuertemente ácido y en presencia de sulfato de plata como catalizador.

#### Reactivos

- ⊃ *Reactivo de ácido sulfúrico:* se disuelven 10 g de sulfato de plata ( $\text{SO}_4\text{Ag}_2$ , P.R.S. de Panreac) en 1 L de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , P.A. de Panreac).
- ⊃ *Solución de dicromato potásico 0.5 N:* se disuelven 24.6 g de dicromato potásico ( $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ , P.A. de Panreac), previamente desecado a 103 °C durante dos horas, en 1 L de agua destilada.
- ⊃ *Solución patrón de ftalato ácido de potasio:* se seca el ftalato ácido de potasio ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{COOHCOOK}$ , P.A. de Panreac) hasta peso constante a 120 °C. Se disuelven 0.85 g en 1 L de agua destilada. El ftalato ácido de potasio tiene una DQO teórica de 1000 p.p.m. de  $\text{O}_2$ .

#### Procedimiento

En un vial se añade: una espátula de sulfato de mercurio ( $\text{SO}_4\text{Hg}_2$ , P.R.S. de Panreac), 4 mL de reactivo de ácido sulfúrico y 1 mL de solución de dicromato potásico. El reactivo así preparado es estable al menos durante un mes. A continuación se añaden 3 mL de la muestra problema y se agitan los viales.

Se introducen los viales en un reactor para la DQO a 150 °C, durante dos horas. Finalizada la digestión se dejan enfriar los viales y a continuación se mide la absorbancia a 620 nm.

La evaluación de los resultados se realiza por medio de una recta de calibrado que da directamente la DQO expresada como  $\text{mg O}_2/\text{L}$ . A continuación se describe como se prepara la recta patrón.

En una serie de tubos de ensayo se preparan las siguientes disoluciones patrón de ftalato:

Tabla III.3.- Recta de calibrado para la determinación de la DQO

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua destilada, mL	10	9.5	9	8	6	4	2	0
Solución ftalato, mL	0	0.5	1	2	4	6	8	10
DQO, $\text{mgO}_2/\text{l}$	0	50	100	200	400	600	800	1000

Se añaden 3 mL de cada una de las disoluciones de ftalato incluido el blanco en un tubo con el reactivo para la DQO y se agita para homogeneizar la mezcla de reacción, se introducen los viales en el reactor a 150 °C durante 2 horas y se mide la absorbancia a 620 nm.

En la Figura III.11 se muestra, a título de ejemplo, una recta de calibrado para la DQO.

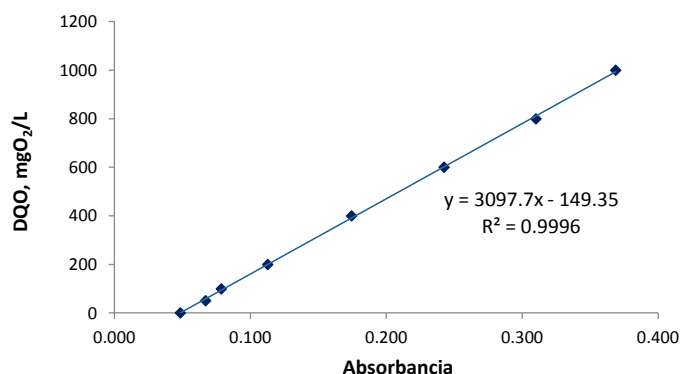
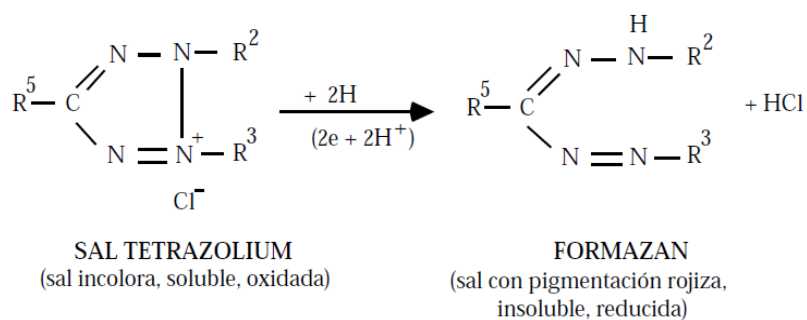
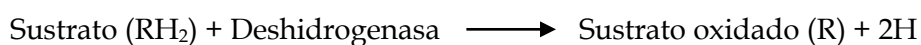


Figura III.11.- Recta de calibrado para la DQO

### 3.4.3.3 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA (DHA)

#### Fundamento

Las variaciones por unidad de tiempo en la actividad respiratoria pueden ser interpretadas como un reflejo de la actividad metabólica de los microorganismos que residen en determinado hábitat. La sal de tetrazolium cloruro de iodo-nitrotrifenil tetrazolium (INT), es utilizada para medir la actividad respiratoria asociada a cadenas de transporte de electrones, dada la rapidez con que son reducidas por la mayoría de los sistemas de deshidrogenasas. Esta sal, al reducirse, precipita formando un complejo insoluble en agua de color rojo intenso.



El precipitado se puede extraer usando alcoholes (metanol, etanol o propanol). La concentración de formazan extraída puede ser determinada por espectrofotometría. El uso de estas sales nos permite estimar la actividad respiratoria ligada a cadenas de transporte de electrones que operan bajo condiciones aeróbicas (respiración aeróbica) y anaeróbicas (respiración anaeróbica).

#### Equipos y reactivos

- ⊏ Reactivo INT: (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride).
- ⊏ Tampón tris-CIH
- ⊏ Ácido sulfúrico concentrado, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ⊏ Etanol, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O
- ⊏ Centrifuga Modelo Universal 320R de HETTICH ZENTRIFUGEN
- ⊏ Espectrofotómetro, Cary 100 Bio UV-Visible de la casa comercial Varian.

## Procedimiento

1. Preparar una disolución 3.95 mM de INT. Para ello diluir 0.5057 g de INT en 1L.
2. Tomar por duplicado 3mL de ésta disolución y mezclar con 4 mL de tampón tris-CIH y 5 mL de muestra.
3. Incubar durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente  $22 \pm 2$  °C.
4. Tras 60 minutos de incubación en oscuridad, interrumpir la reacción con 100 µl de ácido sulfúrico concentrado.
5. Centrifugar la muestra a 1500 g durante 10 minutos.
6. Extraer el "pellets" formado mediante sucesivos lavados con etanol y en oscuridad.
7. Medir la absorbancia a 480 nm.

La actividad de la deshidrogenasa se calcula en equivalentes de oxígeno ( $O_2^*$ ) usando la siguiente ecuación propuesta por Awong y col. (Awong, 1985):

$$DHA = \frac{1024 \cdot A_{480} \cdot v}{V \cdot C \cdot t \cdot F}$$

Ecuación III.5

Donde:

DHA: Actividad INT-deshidrogenasa ( $mg O_2^*g^{-1}$  S.S día<sup>-1</sup>;  $O_2^*$ , unidades de oxígeno equivalente)

1024: Factor de conversión

$A_{480}$ : Absorbancia a una longitud de onda de 480 nm.

v: Volumen final de disolvente usado para la extracción de formazán (mL).

V: Volumen de reactivo utilizado y muestra tratada (mL)

C: Concentración de sólidos volátiles en la muestra (mg/L).

t: Tiempo de incubación (min)

F: Factor de dilución

### 3.4.3.4 TASA DE RESPIRACIÓN ESPECÍFICA (SOUR)

#### Fundamento

La respirometría se basa en la medida de la velocidad del consumo de oxígeno de las bacterias cuando degradan un sustrato orgánico, nitrógeno amoniacal o bien a ellas mismas (respiración endógena). La tasa de respiración (OUR) consiste en la cantidad de oxígeno consumido por las bacterias por unidad de tiempo y se expresa en  $mg O_2/(L \cdot h)$ . Como este parámetro depende de la cantidad de microorganismos presentes en la muestra, habitualmente se trabaja con la tasa de respiración específica (SOUR), que es la tasa de respiración dividida por la cantidad de biomasa de la muestra. Se expresa en  $mg O_2/(g \cdot día)$  y su valor ya sólo depende del estado de la biomasa y de la cantidad y biodegradabilidad del sustrato que tenga disponible.

Comparando el valor de la tasa de respiración específica de la muestra con los valores de referencia, se puede conocer si el proceso biológico está sobrecargado (hay demasiado sustrato para tan poca biomasa), opera a buen rendimiento o, por el contrario, se evidencian síntomas de toxicidad. Para una misma agua residual, el aumento progresivo de la tasa de respiración específica es indicativo de un aumento de la actividad biológica, y a la inversa.



Así pues, la respirometría es una técnica sencilla y práctica, que nos aporta información directa de la biomasa. Nos permite anticiparnos a la mayoría de problemas que pueden afectar al proceso, garantizando que desde el primer momento se están tomando las medidas correctas para paliar el problema. Asimismo, también constituye una herramienta necesaria para optimizar el proceso y determinar parámetros esenciales para su modelización

## Equipos

- ▢ Medidor de oxígeno CRISON Modelo OXI92

## Procedimiento

1. Tomar una muestra de volumen aproximado 50 mL del tanque de aireación en un frasco de la misma capacidad con agitador magnético.
2. Introducir el electrodo de oxígeno del medidor CRISON, protegiendo el contenido de la botella de la atmósfera, de forma que se evitará la transferencia de oxígeno hacia la muestra por medio de un tapón de rosca sellado con silicona.
3. Leer los valores de oxígeno disuelto desde que se estabiliza la lectura cada 30 segundos hasta que éste alcance un valor de 1 mg/L.

Para el cálculo de la tasa de consumo de oxígeno se representa el tiempo frente a las lecturas de oxígeno disuelto (mg/L), y se determina la pendiente de la recta de ajuste óptimo. Ésta representa la tasa de consumo de oxígeno R en mg/L min.

La tasa de respiración específica se calcula por la expresión de Awong y col. (Awong, 1985) utilizando la siguiente ecuación:

$$SOUR = \frac{1440 \cdot R}{C}$$

Ecuación III. 6

Donde:

SOUR: tasa específica de consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub> · g<sup>-1</sup> S.S · día<sup>-1</sup>)

1440: coeficiente que convierte los minutos a días

R: tasa consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/L · min)

C: concentración de biomasa de la muestra (g S.S/L)

## 3.5 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

### 3.5.1 ENSAYO TOXICIDAD LUMISTox®

La medida de la toxicidad mediante el ensayo LUMISTox®, se ha realizado conforme a la [NORMA UNE-EN ISO 11348-2:2009](#) (UNE-EN ISO 11348-2:2009), utilizando bacterias marinas luminiscentes *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 como microorganismos de prueba.

#### 3.5.1.1 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.

### 3.5.1.2 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).

### 3.5.1.3 EQUIPOS

#### LUMISTox

Equipo de medición, unidad de medida y análisis para el ensayo de bacterias luminosas en los ensayos de toxicidad conforme a UNE EN ISO 11348-2:2009 (UNE EN ISO 11348-2:2009).

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

#### Unidad de incubación

Bloque termostatzado a 15 °C para mantener a temperatura constante las muestras utilizadas en el LUMISTox® 300, cumple con la Norma UNE EN ISO 11348-2:2009 (UNE EN ISO 11348-2:2009).

### 3.5.1.4 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  $7 \pm 0.2$  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.

### 3.5.1.5 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. 7

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. 8

donde:

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

Ecuación III. 9

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:

$$\Gamma = \frac{\overline{H_t}}{100 - \overline{H_t}} = \frac{f_k \cdot I_0(c) - I_t(c)}{I_t(c)}$$

Ecuación III. 10

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  $\Gamma$  y la concentración de tensioactivo empleado de la siguiente forma:

$$\text{Log}(C) = b \cdot \text{Log}(\Gamma) + \text{Log}(a)$$

Ecuación III. 11

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.12 se presenta, a título de ejemplo, la linealización para el tensioactivo EC-R<sub>8</sub>E<sub>5</sub>.

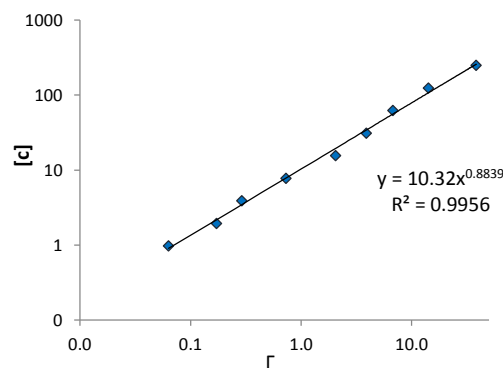


Figura III.12.- Relación lineal entre la función  $\Gamma$  y la concentración para el tensioactivo EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>

### 3.5.1.6 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  $\Gamma$  los valores 1 y 0.25, respectivamente.

### 3.5.2 ECOTOXICIDAD *DAPHNIA MAGNA*

La medida de la ecotoxicidad mediante el ensayo con *Daphnia magna*, se ha realizado conforme a la Norma UNE-EN ISO 6341:2013 (UNE EN ISO 6341:2013), utilizando microcrustáceos *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) como organismos de prueba. El ensayo se realiza mediante el Kit DAPHTOXKIT F™, de acuerdo con la norma ISO 6341 y con OCDE guideline 202 (OCDE, 1984a).

### 3.5.2.1 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.

### 3.5.2.2 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 ( $\pm 2^\circ$  °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<sub>3</sub>
2. Vial 2. Disolución de CaCl<sub>2</sub>
3. Vial 3. Disolución de MgSO<sub>4</sub>
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 derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, los cuales se encuentran en forma ácida, se ajusta el pH a 7 mediante NaOH 1M y/o HCl 1N.

### 3.5.2.3 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.

### 3.5.2.4 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. Estos deben ser desechados, ya que el ensayo 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 ensayados. 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 ensayo 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.

#### **3.5.2.5 EVALUACIÓN**

Una vez han transcurrido 24 horas desde la puesta en contacto con el tensioactivo se evalúa el número de organismos inmovilizados, considerándose estos 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 ensayados para cada concentración (20) se obtiene el % de efecto.

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

Ecuación III. 12

#### **3.5.2.6 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE IC**

El valor de la toxicidad se mide como IC<sub>50</sub>, 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:

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

Ecuación III. 13

Evaluando para 50% de efecto se obtiene el valor para  $EC_{50}$

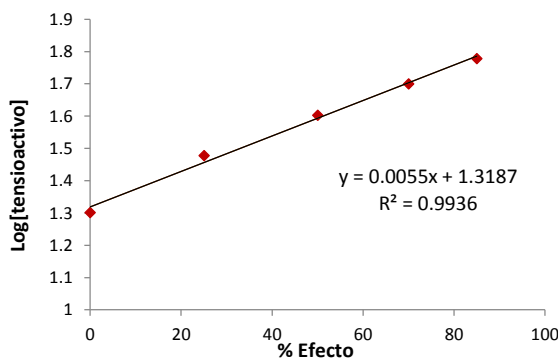


Figura III.13.- Relación lineal entre % Efecto y la concentración para el tensioactivo APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>

### 3.5.3 ECOTOXICIDAD MICROALGAS *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

#### 3.5.3.1 FUNDAMENTO

La medida de la ecotoxicidad mediante el ensayo con microalgas de agua dulce, se ha realizado conforme a la [Norma UNE-EN ISO 8692:2012](#) (UNE-EN-ISO 8692:2012), basado en la inhibición del crecimiento de algas de agua dulce, *Selenastrum capricornutum*. El ensayo se realiza mediante el Kit ALGALTOXKIT F™, de acuerdo con la norma ISO 28692 y con OCDE Guideline 201 (OCDE, 1984b).

El ensayo se basa en la medida de la absorbancia 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 absorbancia pueden ser fácilmente convertidas en n° de algas con ayuda de una recta de regresión patrón proporcionada en el Kit.

#### 3.5.3.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- ▭ Algas *Selenastrum capricornutum*, en forma de rosario inmobilizadas en una matriz inerte y suministrados por MicroBioTest Inc. Deben almacenarse en refrigeración a 5°C (+/- 2° °C).
- ▭ Disolución para disolver la matriz de inmobilización (*Matrix dissolving medium*), 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  $8.1 \pm 0.2$  con disoluciones 1M HCl y/o 1N 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 derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, los cuales se encuentran en forma ácida, se ajusta el pH a 7 mediante NaOH 1M y/o HCl 1N.

### 3.5.3.3 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 absorbancia 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, PiuoPro 3W, 50 Hz.

#### Centrífuga

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

### 3.5.3.4 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 5 mL 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 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 absorbancia 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 absorbancia obtenido, sustituyendo en la recta patrón se obtiene la concentración del n° 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. 14

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.

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 1 mL 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 ( $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  y  $C_5$ ) y una de control ( $C_0$ ) 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 absorbancia 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 ensayos de toxicidad establece que las algas deben estar continuamente en suspensión para facilitar la transferencia de CO<sub>2</sub>, y reducir la variación de pH, sin embargo detalladas investigaciones revelan que la resuspensión una vez al día inmediatamente antes de medir la absorbancia es suficiente para obtener el mínimo número de divisiones de algas prescrito en el procedimiento estándar.

### E) Medida de la absorbancia

El seguimiento de la inhibición del crecimiento se realiza midiendo la absorbancia 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 absorbancia para todas las cubetas, es necesario volver a colocarlas de forma aleatoria en el set, dejándolas abiertas por uno de los lados.

#### 3.5.3.5 EVALUACIÓN

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

Con estos valores, mediante representación de Log(Abs) 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 ( $\mu$ ) también se puede evaluar mediante:

$$\mu(Cx) = \frac{\text{Log Abs}_{72 \text{ horas}} - \text{Log Abs}_{0 \text{ horas}}}{72 \text{ horas}}$$

Ecuación III. 15

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

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

Ecuación III. 16

#### 3.5.3.6. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC

El valor de la toxicidad se mide como EC<sub>50</sub>, 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:

$$\text{Log}[tensiactivo] = A \cdot \% \gamma + B$$

Ecuación III. 17

Evaluando para 50% de tasa de Inhibición se obtiene el valor para EC<sub>50</sub>

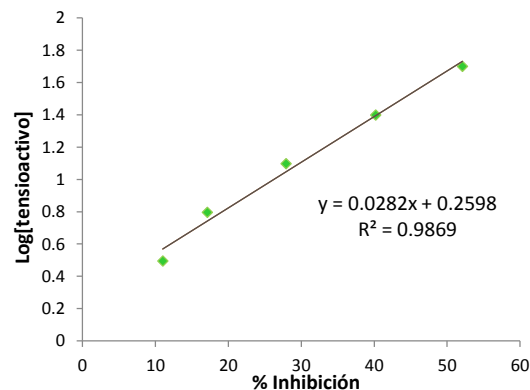


Figura III.14.- Relación lineal entre % Inhibición y la concentración para el tensioactivo APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1,3</sub>

### 3.6 ENSAYOS CON OXIDACIÓN AVANZADA DE TENSIOACTIVOS

#### 3.6.1 TRATAMIENTO CON OZONO

Se han utilizado dos formas de ozonización de las disoluciones de tensioactivo en función del tipo de ensayo que se realiza tras la ozonización:

- Ensayo de biodegradación estático.
- Resto de ensayos: biodegradación con *P. putida* y toxicidad con *V. fischeri*.

##### 3.6.1.1 FUNDAMENTO

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

##### 3.6.1.2 EQUIPOS

Los equipos utilizados han sido:

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

##### 3.6.1.3 MONTAJE EXPERIMENTAL PARA ENSAYO DE BIODEGRADACIÓN ESTÁTICO

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

En la Figura III.15 se muestra un esquema del sistema utilizado para la ozonización en este tipo de ensayos.

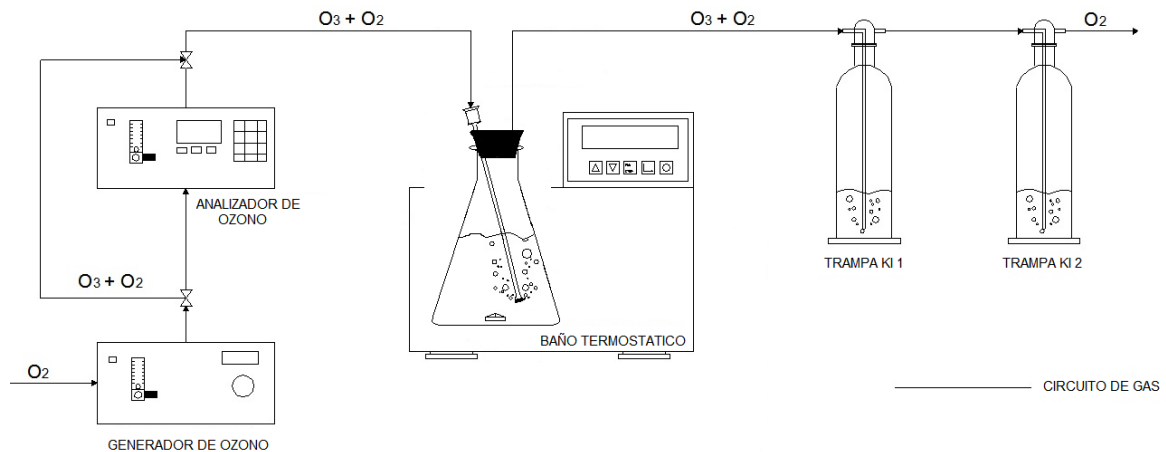


Figura III.15.- Esquema de ozonización para los ensayos estáticos de biodegradación

### Procedimiento

1. Limpiar todo el material siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de limpieza (Apartado 3.7).
2. Poner en marcha el sistema de termostático a la temperatura de ensayo.
3. Preparar el ensayo de biodegradación estático tal como se describe en el apartado 3.3.1 sin adicionar el inóculo de bacterias sobre un Erlenmeyer de 2L.
4. Colocar el imán en el Erlenmeyer y activar la agitación.
5. Rellenar las trampas con 200 mL de disolución al 5% en peso de KI.
6. Activar el sistema de extracción de gases de la campana.
7. Abrir el flujo de oxígeno al sistema y fijar el caudal de ensayo.
8. Encender el analizador y el generador de ozono asegurándose de que está desactivada la producción de ozono.
9. Una vez operativo el analizador de ozono, y asegurándonos de que la sonda difusora de ozono esta fuera del matraz erlenmeyer, fijar y activar la producción de ozono a la concentración deseada.
10. Cuando la concentración de ozono esté estabilizada en el valor deseado introducir la sonda de burbujeo, fijada sobre el tapón, en el Erlenmeyer; activar el cronómetro y ozonizar el tiempo deseado.
11. Tras la ozonización se podrá proseguir con el inóculo de bacterias para el ensayo de biodegradación estático tal y como describe el apartado 3.3.1.

En todo momento hay que tener en cuenta que el ozono es tóxico, siempre que se acceda al interior de la campana de gases y sobre todo al finalizar la ozonización y quitar el tapón del Erlenmeyer, se deberá usar una máscara de gases de conformidad con la [NORMA UNE-EN 405:2002+A1:2010](#), (UNE-EN 405:2002+A1:2010).

#### 3.6.1.4 MONTAJE EXPERIMENTAL PARA EL RESTO DE ENSAYOS

Para la ozonización de las disoluciones de tensioactivo utilizadas en los ensayos de biodegradación con *P. putida* y toxicidad con *V. fischeri* se utiliza el siguiente sistema que se muestra en la Figura III.16.

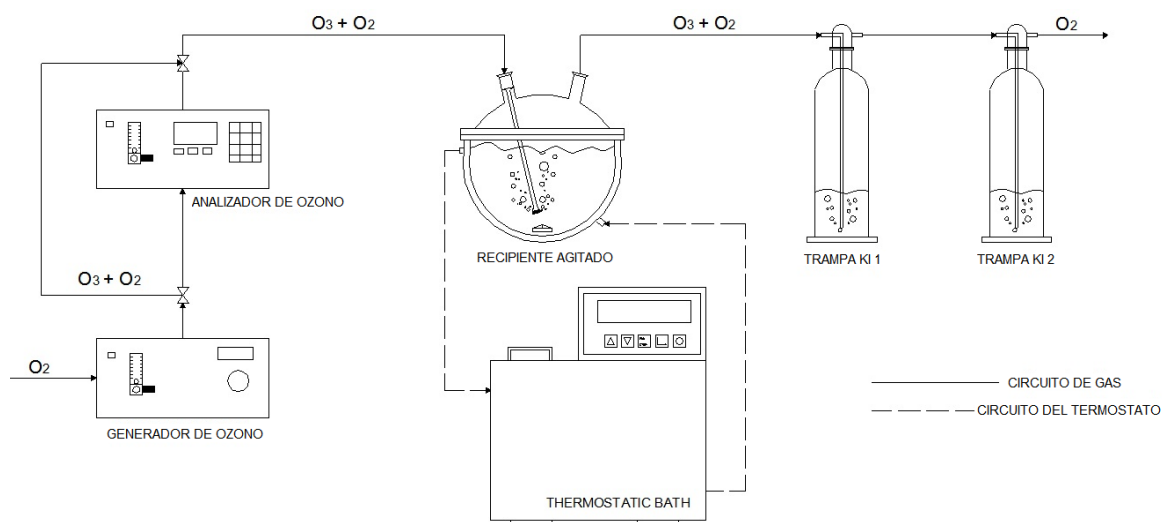


Figura III.16.- Esquema de ozonización general para muestras de tensioactivo.

### Procedimiento

1. Limpiar todo el material siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de limpieza (Apartado 3.7).
2. Poner en marcha el sistema de termostatizado a la temperatura de ensayo.
3. Colocar el imán agitador, 200 mL de la disolución a ozonizar y tapar.
4. Rellenar las trampas con 200 mL de disolución al 5% en peso de KI.
5. Activar el sistema de extracción de gases de la campana.
6. Abrir el flujo de oxígeno al sistema y fijar el caudal de ensayo.
7. Encender el analizador y el generador de ozono asegurándose de que está desactivada la producción de ozono.
8. Una vez operativo el analizador de ozono, y asegurándonos de que la sonda difusora de ozono esta fuera del reactor, fijar y activar la producción de ozono a la concentración deseada.
9. Cuando la concentración de ozono esté estabilizada en el valor deseado introducir la sonda de burbujeo en el reactor, activar el cronómetro y comenzar la toma de muestras cuando corresponda.
10. Una vez finalizado el tiempo de ozonización, se guardan las muestras en viales de vidrio que posteriormente serán utilizadas para llevar a cabo los ensayos de biodegradación con *P. putida* (apartado 3.3.4) y/o toxicidad con *V. fischeri* (apartado 3.5.1). Si las muestras no van a ser utilizadas en el momento se congelan.

## 3.7 PROTOCOLO DE LIMPIEZA

### 3.7.1 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 persulfato amónico  $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$  disuelto en ácido sulfúrico  $(\text{H}_2\text{SO}_4)$ .
- Enjuague con agua corriente.
- Enjuague final con agua desionizada.

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

### 3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Awong, J., Bitton, G., Koopman, B. (1985). ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Research*, 7:917-921.
- Ballesteros-Martín, M.M., Casas-López, J.L., Oller, I., Malato, S., Sánchez-Pérez, J.A. (2010). A comparative study of different tests for biodegradability enhancement determination during AOP treatment of recalcitrant toxic aqueous solutions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6):1189-1195.
- 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.
- Burnett, C.L. (2008). Amended final report of the safety assessment of Cocamidopropylamine oxide. *International Journal of Toxicology*, 27(1):55-62.
- Buschmann, N., Kruse, A., Wodarczak, S. (1995). Analytical methods for alkylpolyglucosides. I: Colorimetric Determination. *Tenside Surfactants Detergents*, 32(4): 336-339.
- Cross, J. (1994). Cationic Surfactants. In J. Cross, J. Singer (Eds.), Analytical and biological evaluation. Surfactant Science Series (53, pp.140-175). Marcel Dekker, New York.
- Domingo, A. (1995). A guide to the surfactants world. Proa, Barcelona.
- García, M.T., Campos, E., Ribosa, I. (2007). Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere*, 69(10):1574-1578.
- Gottschalck, T. E., McEwen, G.N. (2006). International cosmetic ingredient dictionary and handbook. Personal care product council, Washington DC.
- HERA Report. (2013). Linear alkylbenzene sulphonate. Environmental risk assessment. Revised environmental aspect of the HERA report.
- Jurado, E., Fernández-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. *Tenside Surfactants Detergents*, 39:154-159.
- Jurado, E., Fernández-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., Fernández-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10:145-153.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Lechuga, M., Ríos, F. (2011). Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 144:497-505.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Lechuga, M., Jiménez, J.L., Ríos, F. (2012). Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: A comparative study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(2):290-295.

- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Lechuga, M., Ríos, F. (2012). Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(1):1-7.
- Kuhn, A.V., Neubert, R.H.H. (2004). Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharmaceutical Research*, 21(12):2347-2352.
- Maguire, R. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1):37-78.
- Merrettig-Bruns, U., Jelen, E. (2003). Study on the anaerobic biodegradation of detergent Surfactants. Final Report. Fraunhofer Institute for Environmental, Safety and Energy Technology UMSICHT, Oberhausen.
- OCDE (1993b). OCDE Guideline for Testing of Chemicals, "Ready Biodegradability", OCDE. París. Francia.
- OCDE (1984a). OCDE Guideline for Testing of Chemicals, 202. *Daphnia* sp reproduction test. OCDE. París. Francia.
- OCDE (1984b). OCDE Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, growth inhibition test. OCDE. París. Francia.
- 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).
- Reuschenbach, P., Pagga, U., Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research*, 37:1571-1582.
- Salager, J., Anton, R. (2005). Métodos de medición de la tensión superficial o interfacial *Cuaderno FIRP S205-B*. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de los Andes. Mérida.
- Schöberl, P. (1991). Coupling the OECD confirmatory test with continuous ecotoxicity tests. *Tenside Surfactants Detergents*, 28(1):6-14.
- Shim, H., Shin, E., Yang, S.T. (2002). A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Advances in Environmental Research*, 7(1):203-216.
- Soares, A., Murto, M., Guieysse, B. (2006). Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5):597-606.
- UNE 55523:1990. Norma UNE 55523:1990: Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos aniónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE 55844:1991. Norma UNE 55844:1991: Determinación de la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos empleados en la fabricación de formulaciones detergentes.
- UNE EN 903:1994. Norma UNE EN 903:1994 : Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM.

- UNE-EN 8692:2012. Norma UNE EN ISO 8692:2012: Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas de agua dulce con algas verdes unicelulares.
- UNE-EN 405:2002+A1:2010. Norma UNE-EN 405:2002+A1:2010: Equipos de protección respiratoria. Medias máscaras filtrantes con válvulas para la protección contra gases o contra gases y partículas. Requisitos, ensayos, marcado.
- UNE-EN ISO 10253:2007. Norma UNE-EN ISO 10253:2007: Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas marinas con *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricorutum*.
- UNE-EN ISO 11348-2:2009. Norma UNE-EN ISO 11348-2:2009: Calidad del agua. Determinación del efecto inhibitorio de muestras de agua sobre la luminiscencia de *Vibrio fischeri* (Ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 2: Método utilizando bacterias deshidratadas.
- UNE EN ISO 6341:2013. Norma UNE-EN ISO 6341:2013: Calidad de agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Ensayo de toxicidad aguda.
- Yu, Y., Zhao, J., Bayly, A. (2008). Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(4):517-527.





# Capítulo 4

## Resumen de los Trabajos Presentados

En esta Tesis Doctoral los resultados se presentan como una agrupación de publicaciones; consta de siete artículos de investigación publicados en revistas científicas de impacto, y un capítulo de libro. Con el fin de facilitar la lectura y comprensión de los resultados expuestos, los trabajos se presentan divididos en tres bloques: biodegradación, toxicidad y ozonización de tensioactivos.

A continuación se enumeran los trabajos que se presentan en la Tesis y los indicios de calidad de cada una de las publicaciones.

### BLOQUE I.- BIODEGRADACIÓN DE TENSIOACTIVOS

1. Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation test. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga, J.L. Jiménez and F. Ríos. (2011). *Water Environment Research*. 83 (2), 154-161. DOI: [10.2175/106143010X12780288628336](https://doi.org/10.2175/106143010X12780288628336).

Índice de Impacto: 1.134 (JCR)

Posición que ocupa la revista en la categoría: 41 de 80

Categoría: Water Resources

Cuartil: Q3

2. Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, M. Lechuga and F. Ríos. (2012). *Journal of Surfactants and Detergents*. 15 (1), 1-7. DOI: [10.1007/s11743-011-1278-z](https://doi.org/10.1007/s11743-011-1278-z).

Índice de Impacto: 1.515 (JCR)

Posición que ocupa la revista en la categoría: 49 de 133

Categoría: Chemical Engineering

Cuartil: Q2

3. Aerobic biodegradation of surfactant. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, F. Ríos and M. Lechuga (2013). In R. Chamy, F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*. (pp.66-81). InTech, Rijeka. DOI: [10.5772/56120](https://doi.org/10.5772/56120).

## BLOQUE II.- TOXICIDAD DE TENSIOACTIVOS

4. Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga and F. Ríos. (2011). *WIT Transactions on Ecology and the Environment*. 144, 497-505. DOI: [10.2495/ECO110431](https://doi.org/10.2495/ECO110431).

Índice de Impacto: 0.156 (SJR); 0.097 (SNIP)  
Categoría: Environmental Science

5. Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Microalgae: a comparative study. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga, J.L. Jiménez and F. Ríos. (2012). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 88 (2), 290-295. DOI: [10.1007/s00128-011-0479-5](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0479-5).

Índice de Impacto: 1.105 (JCR)  
Posición que ocupa la revista en la categoría: 148 de 210  
Categoría: Environmental Science  
Cuartil: Q3

## BLOQUE III.- OZONIZACIÓN DE TENSIOACTIVOS

6. Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants. M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Fernández-Arteaga, A. Burgos and F. Ríos. (2012). *Procedia Engineering*. 42, 1038-1044. DOI: [10.1016/j.proeng.2012.07.495](https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.495).

Índice de Impacto: 0.165 (SJR); 0.314 (SNIP)  
Categoría: Engineering

7. Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants. M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Burgos and F. Ríos. (2014). *Journal of Surfactants and Detergents*. 17 (2), 363-370. DOI: [10.1007/s11743-013-1480-2](https://doi.org/10.1007/s11743-013-1480-2).

Índice de Impacto: 1.515 (JCR)  
Posición que ocupa la revista en la categoría: 49 de 133  
Categoría: Chemical Engineering  
Cuartil: Q2

8. Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: impact on aquatic toxicity. M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Burgos and F. Ríos. (2013). *Journal of Surfactants and Detergents*. 16 (5), 779-784. DOI: [10.1007/s11743-013-1464-2](https://doi.org/10.1007/s11743-013-1464-2).

Índice de Impacto: 1.515 (JCR)  
Posición que ocupa la revista en la categoría: 49 de 133  
Categoría: Chemical Engineering  
Cuartil: Q2

# Capítulo 5

## Trabajos Publicados



## **5.1-. Bloque I: Biodegradación de Tensioactivos**



### 5.1.1 Artículo

## Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation test

E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga, J.L. Jiménez and F. Ríos.

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

Publicado en:



**Water Environment Research**

Editor: Water Environment Federation

601 Wythe Street, Alexandria, VA 22314-1994. EEUU.

Volumen 83, número 2. Páginas 154-161.

Año: 2011

ISSN: 1061-4303

DOI: [10.2175/106143010X12780288628336](https://doi.org/10.2175/106143010X12780288628336)





### 5.1.1.1 RESUMEN

En este estudio se examina la biodegradación primaria y última de un tensioactivo no iónico del tipo alquilpoliglucósido, mediante ensayos de biodegradabilidad fácil. La concentración fue analizada utilizando el método de la antrona, mientras que la biodegradación última fue analizada mediante medidas del carbono orgánico total. También se determinó la influencia de la concentración sobre la biodegradación primaria y última, así como la cinética de degradación. La biodegradación primaria y última fueron estudiadas a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo: 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L. El incremento de la concentración del compuesto de 15 a 100 mg/L conlleva una disminución en la velocidad relativa máxima de mineralización y mayores tiempos de latencia, con un factor de aumento de aproximadamente 4.3. Durante el proceso de degradación se observan dos etapas, las cuales están bien descritas por Quiroga y modelos cinéticos de primer orden, respectivamente. Para el estudio de la influencia de la concentración fueron evaluados los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación en los diferentes ensayos.

*Palabras clave:* alquilpoliglucósidos, biodegradación aerobia, tensioactivos no iónicos, análisis.

### 5.1.1.2 ABSTRACT

This study examines the primary and ultimate biodegradation of a non-ionic surfactants, an alkylpolyglucoside, in ready biodegradability tests. The surfactant concentration was tested by the anthrone method, while the ultimate biodegradation (mineralization) was analyzed by the total organic carbon determinations. The influence of the concentration on the extent of primary and ultimate biodegradation and the kinetics of degradation also were determined. The primary and ultimate biodegradation was studied at different initial concentrations: 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L. The increasing concentration of test chemical from 15 to 100 mg/L resulted in a decrease in the relative maximum mineralization rate and longer estimated lag times by a factor of approximately 4.3. During the degradative process, two different stages were noted; these are better described with Quiroga and first-order kinetic models, respectively. For the study of the influence of concentration, the parameters characteristics of the biodegradation profiles in the different biodegradation assays were evaluated.

*Keywords:* alkylpolyglucosides, aerobic biodegradability, non-ionic surfactants, analysis.



### 5.1.1.3 INTRODUCCIÓN

Los alquilpoliglucósidos (APGs) son un tipo de tensioactivos no iónicos en creciente uso. Debido a sus excelentes propiedades espumantes y que presentan efectos sinérgicos con otros tensioactivos, se utilizan en lavavajillas, lavandería y otros productos de limpieza (Zgola, 2008). Además, su buena tolerancia en la piel les hace adecuados para el uso en productos de cuidado personal (Kuhn, 2004). Estos tensioactivos se preparan a partir de materias primas renovables, (almidón/azúcar, y aceites vegetales), y como se trata de compuestos químicos pertenecientes a una nueva clase de tensioactivos, pocos estudios han abordado sus implicaciones ambientales. Los alquilpoliglucósidos, al igual que todos los tensioactivos, tras su uso son vertidos en las aguas domésticas y entran en el medio acuático. Generalmente, la acumulación de tensioactivos en el medio ambiente está estrechamente relacionada con su biodegradabilidad, debido a que la biodegradación es el principal mecanismo de mineralización para las sustancias químicas en medios acuáticos y terrestres. Por lo tanto, es el requisito más importante para que un tensioactivo sea compatible con el medio ambiente es que tenga una rápida y completa biodegradación (Hill, 1997).

Los ensayos de biodegradabilidad juegan un papel muy importante en la valoración del comportamiento ambiental de los tensioactivos. Existen numerosos ensayos que se utilizan para la medida de la biodegradabilidad (Zgola, 2008); entre ellos, ensayos estandarizados recomendados por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (París, Francia) (OCDE, 1993; OCDE, 2001).

En este estudio, el APG fue estudiado en un ensayo de biodegradabilidad fácil, el ensayo de la OCDE "ensayo estático". En este ensayo se determina la biodegradación primaria y última del compuesto analizado a diferentes concentraciones iniciales. Este ensayo discontinuo se caracteriza por sus condiciones restrictivas, las cuales se atribuyen a la relativamente alta relación compuesto ensayado/inóculo en la que el compuesto es la única fuente de carbono. Aunque los APGs son tensioactivos no-iónicos, el proceso rutinario analítico para seguir la biodegradación primaria de tensioactivos no iónicos, llamado método de las sustancias activas al bismuto (BiAS) (EEC, 1982), no puede ser utilizado porque los APGs no reaccionan como BiAS, y los requerimientos legales de biodegradabilidad para tensioactivos no iónicos ( $\geq 80\%$ ) no se aplican a este grupo de tensioactivos. Sin embargo, los ensayos de la OCDE de biodegradabilidad fácil (series OCDE 301) representan un grupo de aplicación general para la evaluación de la mayoría de productos químicos. La concentración de tensioactivo fue evaluada mediante el método de la antrona, y la biodegradación última (mineralización) fue analizada mediante medidas del carbono orgánico total. Los resultados del ensayo de biodegradabilidad fácil muestran que los APGs son fácilmente biodegradables y, de acuerdo a las conclusiones de la OCDE (OCDE, 1993), experimentan una rápida y final biodegradación en el medio ambiente. Los tensioactivos pueden considerarse fácilmente biodegradables, de acuerdo a los requerimientos de la OCDE, si la biodegradación primaria es mayor del 80%. Se encontró que la tasa y los perfiles de biodegradación dependen de la concentración inicial de tensioactivo, y que la ruta de biodegradación de los alquilpoliglucósidos está basada en la escisión central de la molécula.

### 5.1.1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Los tensioactivos utilizados en este estudio fueron el alquilpoliglucósido Glucopone 650 CS UP (APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>), suministrado por Henkel-Cognis (Düsseldorf, Alemania), y el

lineal alquilbenceno sulfonato LAS-R<sub>11-14</sub>, suministrado por Petresa (Madrid, España) (apartado 3.1).

El ensayo de biodegradación fue llevado a cabo de acuerdo con el ensayo para biodegradabilidad fácil de la OCDE 301, "Ensayo Estático" (apartado 3.3.1) en el que el tensioactivo representa la única fuente de carbono para los microorganismos. El proceso de biodegradación fue evaluado mediante medidas de la concentración residual de tensioactivo en el tiempo utilizando el método de la antrona (apartado 3.4.1.3), que se basa en la reacción entre la antrona y el grupo glucósido en medio de ácido sulfúrico, y mediante medidas del carbono orgánico total (TOC) (apartado 3.4.1.4). El APG se determinó también mediante cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (apartado 3.4.1.5).

El ensayo estático de biodegradación se realizó a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo, 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L.

Se efectuó un ensayo de referencia con el tensioactivo fácilmente biodegradable, LAS-R<sub>11-14</sub>, para determinar la actividad de la población microbiana presente en el medio. La concentración inicial de tensioactivo fue 5 mg/L en todos los casos, y en 5 días las medidas de la biodegradabilidad alcanzaron el  $97.28 \pm 1.54$  %. De acuerdo con la OCDE (OCDE, 1993), para la aceptación del ensayo como válido, es necesario una biodegradación del patrón blando mayor del 90 % después de 5 días, por tanto se consideró como válido.

Se conoce que la adsorción puede influenciar significativamente en los efectos medioambientales de los tensioactivos (Belanger, 2006), esto fue estudiado por Van Compernelle y col. (Van Compernelle, 2006). En los ensayos de biodegradación realizados en este estudio, dada la escasa formación de biomasa, la adsorción se considera despreciable. Para confirmar este hecho, se realizaron ensayos abióticos en presencia de HgCl<sub>2</sub>, y se obtuvo que los valores residuales de tensioactivo permanecieron aproximadamente al 100% durante el periodo de biodegradación. Estos resultados indican que la contribución del proceso abiótico a la degradación de los APGs en el ensayo de biodegradación puede considerarse nula.

Durante el ensayo de biodegradación, el número de microorganismos viables fue medido mediante recuento de la biomasa en placa (APHA, 1992) (apartado 3.4.2), expresando el resultado como unidades formadoras de colonias por mL (UFCs), Figura V.1.

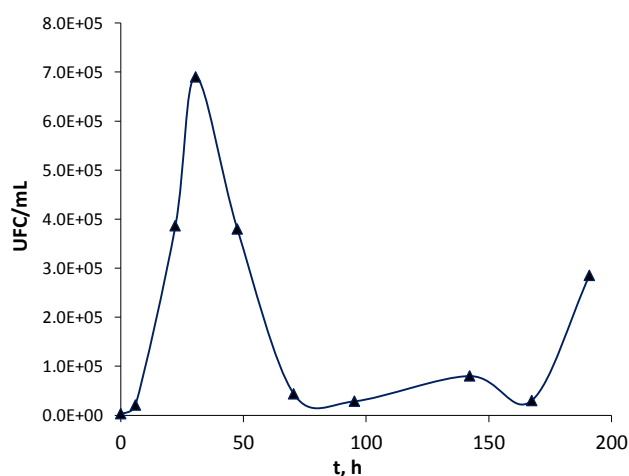


Figura V.1.- Curva de crecimiento de unidades formadoras de colonias para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> a 15 mg/L

### 5.1.1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de comenzar con el estudio de la biodegradación primaria y última del APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>, el tensioactivo fue analizado mediante cromatografía. En la Figura V.2 se muestra el cromatograma para este tensioactivo. De acuerdo con él, la estructura del tensioactivo difiere ligeramente de los datos proporcionados por el suministrador (Henkel-Cognis, Düsseldorf, Alemania), debido a que el número de carbonos en la cadena alquílica es R<sub>8-18</sub> en lugar de R<sub>8-14</sub>. Sin embargo, estos resultados son consistentes porque el suministrador ofrece valores medios.

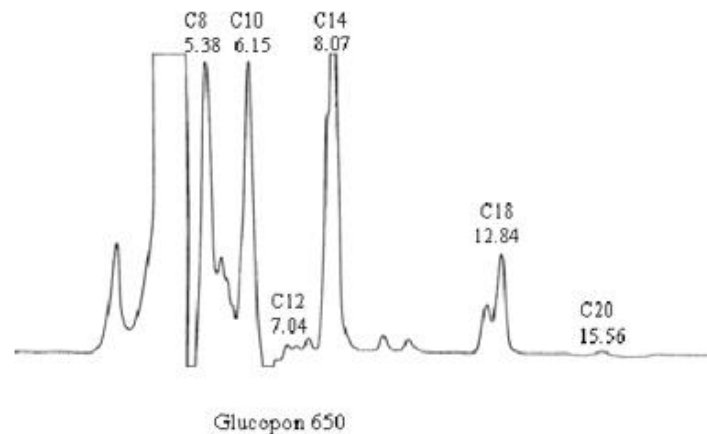


Figura V.2.- Cromatograma para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>

### Biodegradación primaria de alquilpoliglucósidos

La Figura V.3 muestra la evolución de la concentración residual de APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> durante el periodo de degradación. Las concentraciones iniciales en los ensayos fueron 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L. Mediante el método de la antrona se obtuvieron los resultados de biodegradación primaria.

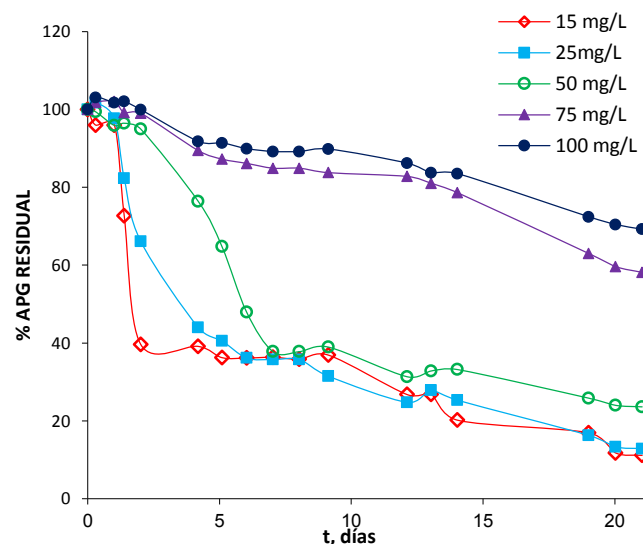


Figura V.3.- Evolución de la concentración residual de APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> durante el tiempo de biodegradación para diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo

En un análisis preliminar de los perfiles de biodegradación primaria, Figura V.3, se encontró que la concentración residual de tensioactivo rápidamente disminuye con el tiempo de biodegradación. Cuando la concentración inicial de tensioactivo aumenta, esta disminución es menos pronunciada. Las curvas de biodegradación para 75 y 100 mg/L

difieren significativamente del resto de las concentraciones estudiadas; la forma de la curva fue exponencial, y el proceso de biodegradación se ralentiza.

Para comparar y cuantificar los diferentes ensayos de biodegradación, los siguientes parámetros, los cuales son característicos del perfil de biodegradación (Jurado, 2007), fueron evaluados:

- **Tiempo de latencia ( $t_L$ , h)** 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, depredación 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.
- **Tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ , h)** 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 engloba 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.
- **Velocidad media de biodegradación ( $V_M$ , %/h)** 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 30 % 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.
- **Concentración de tensioactivo residual ( $S_R$ , mg/L)** 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.
- **Biodegradabilidad del tensioactivo ( $B$ , %)** se define como el porcentaje de tensioactivo biodegradado a las 50 horas del ensayo.
- **Biodegradación final ( $B_f$ , %)** se define como porcentaje de biodegradación primaria alcanzado al final del ensayo.
- **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.1 se muestran los parámetros característicos para los perfiles de biodegradación del APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> para todas las concentraciones ensayadas.  $S_0$  es la concentración inicial de tensioactivo en mg/L,  $t_T$  el tiempo total del ensayo.

Tabla V.1.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>

S <sub>0</sub> , mg/L	t <sub>r</sub> , h	t <sub>L</sub> , h	t <sub>1/2</sub> , h	V <sub>M</sub> , %/h	S <sub>R</sub> , mg/L	B, %	B <sub>f</sub> , %	Min, %
15	504.75	29.01	74.41	0.82	2.24	62.09	88.83	99.20
25	504.75	38.71	122.25	0.70	3.21	29.12	87.13	97.17
50	504.75	56.11	156.75	0.28	14.43	5.21	76.38	95.80
75	504.75	86.26	-	0.08	42.48	1.02	41.88	50.34
100	504.75	125.37	-	0.06	68.51	0.04	30.77	45.21

La concentración inicial de tensioactivo modifica la forma de la curva resultante, la velocidad media de biodegradación (V<sub>M</sub>), y el porcentaje de biodegradación alcanzado (B<sub>f</sub>) (Tabla V.1). Además, la concentración inicial de tensioactivo afectó al tiempo de aclimatación de los microorganismos, t<sub>r</sub>; dicho valor varía entre 29.01 h para el ensayo de 15 mg/L, y 125.73 h para el ensayo de 100 mg/L. La concentración residual de tensioactivo al final del ensayo (S<sub>R</sub>), y el tiempo de latencia (t<sub>L</sub>), aumentan notablemente con el incremento de la concentración inicial de tensioactivo.

Los datos de la Tabla V.1 muestran que el alquilpoliglucósido APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> es fácilmente biodegradable. La biodegradación primaria después de 21 días (a 15 mg/L) es mayor del 80% de acuerdo con lo establecido por la OCDE en el ensayo de biodegradabilidad fácil. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por García y col. (Gracia, 1997) y Qin y col. (Qin, 2006).

Sin embargo, a altas concentraciones el tensioactivo muestra mucha menor biodegradabilidad. Esto es así debido a que el tiempo de adaptación que necesitan los microorganismos para este tensioactivo es elevado, el cual no suele estar incluido en las formulaciones detergentes convencionales. Además, esto puede ser debido a que el APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> es muy insoluble a altas concentraciones, el tensioactivo se encuentra en forma de suspensión, y solo una pequeña parte de este alquilpoliglucósido está disponible para ser biodegradado por las bacterias (Zgola, 2008). De esta manera, un aumento en la concentración inicial de tensioactivo conlleva una menor velocidad de biodegradación. La Ecuación V.1 y la Figura V.4 muestran la dependencia de la biodegradabilidad con la concentración de APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>.

$$B = 261.6e^{-0.083 \cdot S_0}$$

Ecuación V.1

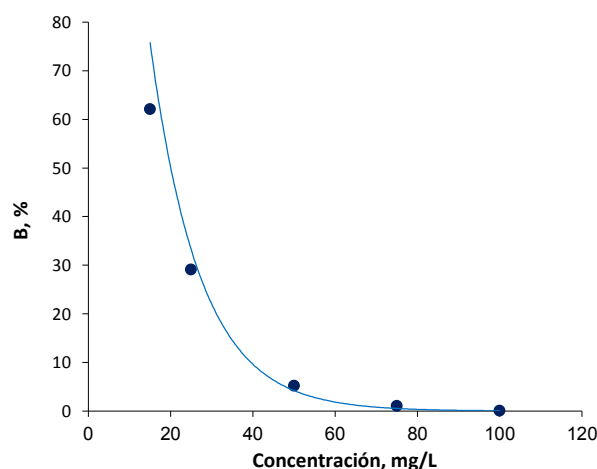


Figura V.4.- Dependencia de la biodegradabilidad con la concentración de tensioactivo



## Biodegradación última de alquilpoliglucósidos

Junto con la biodegradación primaria, se ha establecido la biodegradación última del alquilpoliglucósido ensayado bajo condiciones aeróbicas en el ensayo de la OCDE para biodegradabilidad fácil. La Figura V.5 muestra la evolución de la biodegradación última durante el periodo de biodegradación para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>. Las concentraciones iniciales de tensioactivo fueron 15, 25, 50, 75 y 100 mg/L.

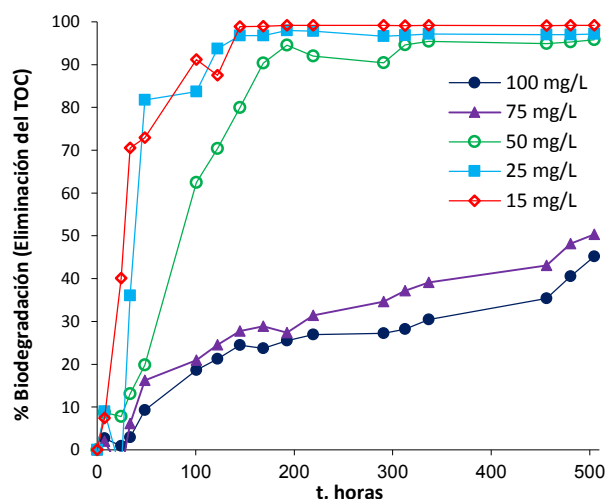


Figura V.5.- Evolución de la biodegradación última para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> durante el tiempo de biodegradación para diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo

En la Tabla V.1 se muestran la mineralización final alcanzada al final del ensayo, Min (%), calculada usando la siguiente expresión:

$$Min (\%) = \frac{[TOC]_i - [TOC]_f}{[TOC]_i} \cdot 100$$

Ecuación V.2

El tensioactivo alcanzó un 99.20 % de eliminación del TOC para el ensayo de 15 mg/L y 45.21 % para el de 100 mg/L al finalizar el ensayo. Estos resultados aseguran que la alta degradación primaria del APG está conectada con la elevada biodegradación última. En la Figura V.6 se muestra la evolución del porcentaje de biodegradación primaria y última para el APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>.

## Rutas de biodegradación de alquilpoliglucósidos

En los perfiles de biodegradación (Figura V.3), para todas las concentraciones, se distinguen claramente dos etapas. La primera etapa, Etapa A, va desde el inicio hasta el duodécimo día, y corresponde a la fase de latencia. La evolución de la concentración de los APGs, en todos los casos, tiene una zona de perfil plano en las curvas de biodegradación. Este fenómeno está relacionado con las rutas de biodegradación del tensioactivo. Estudios sobre la biodegradación de APGs sugieren que los APG son hidrolizados a alcohol y polisacáridos en la primera etapa, y el alcohol es oxidado a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O mediante  $\beta$  o  $\alpha$  oxidación, el polisacárido es hidrolizado a glucosa, y finalmente la glucosa se degrada mediante un mecanismo metabólico. En teoría son posibles varias rutas de biodegradación. Federle y Itrich (Federle, 2006) sugieren la  $\omega$ -oxidación de APGs con la posterior escisión central que conduce al ácido carboxílico. Eichhorn y Knepper (Eichhorn, 1999) también sugieren una segunda ruta de biodegradación, la  $\omega$ -oxidación de la cadena alquílica seguida de acortamiento de la cadena durante el proceso de  $\beta$ -oxidación.

La segunda etapa, Etapa B, va desde el decimotercer día hasta el final del ensayo. La ruta de biodegradación con la escisión central para obtener alcohol y polisacárido en la primera etapa fue confirmada utilizando HPLC con detector de infrarrojo, cromatografía líquida con espectrometría de masas (HPLC-MS), y medidas de tensión superficial durante el proceso de biodegradación.

La Figura V.7 muestra las rutas de biodegradación propuestas para el APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>. Estas rutas son el resultado de considerar las rutas encontradas en la literatura para APGs (Eichhorn, 1999; Zhang, 2003; Quin, 2006; Zgola, 2008; El-Sukkar, 2009) y los resultados publicados por esos autores.

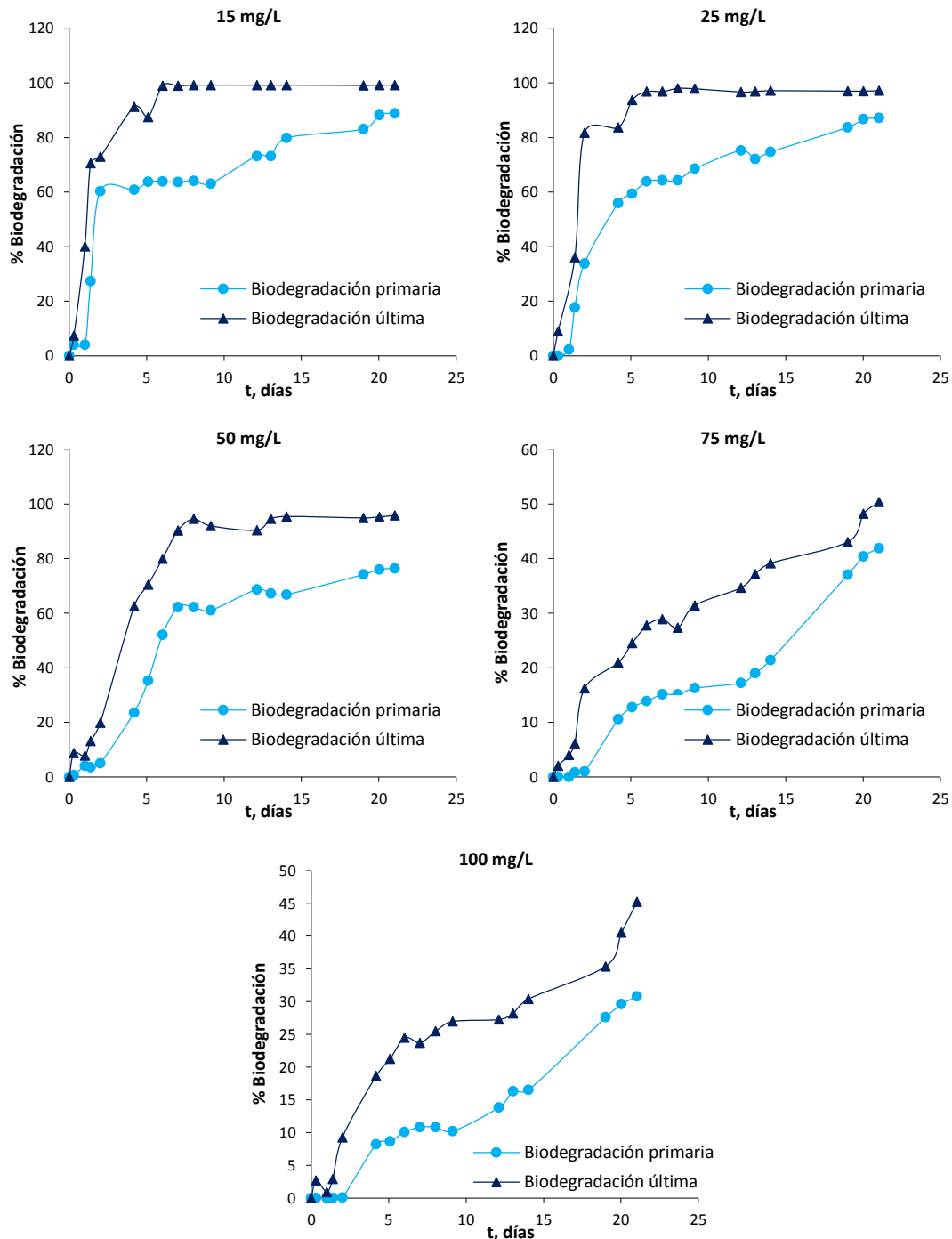


Figura V.6.- Evolución del porcentaje de biodegradación primaria y última para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>

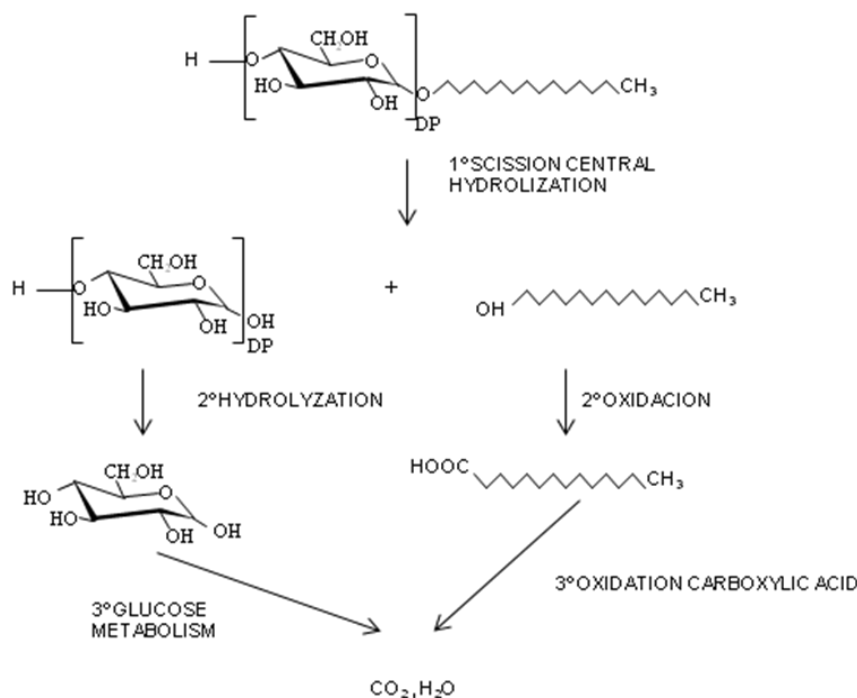


Figura V.7.- Rutas de biodegradación propuestas para APGs

El alcohol producido no puede ser determinado por el método de la antrona, de modo que la estructura o la cadena no tuvo un efecto apreciable sobre la biodegradación de APG. Al inicio, la velocidad de biodegradación fue muy alta; sin embargo, una vez sobrepasado el 50 % de biodegradación, el proceso se vuelve más lento a las mayores concentraciones, como se refleja en el hecho de que la velocidad media de biodegradación disminuye desde 0.82%/h (para 15 mg/L) hasta 0.06 %/h (para 100 mg/L).

Por otra parte, si las UFCs son analizadas, se encuentra que el número de UFCs disminuye durante el periodo correspondiente a la fase de perfil plano de las curvas de degradación. Esto también significa que los microorganismos tienen que adaptarse a los nuevos productos de biodegradación (Zgola, 2008). El análisis de biodegradación de APG-R<sub>s</sub>-<sub>14</sub>DP<sub>1.3</sub> mediante HPLC-MS indicó que, al principio la biodegradación de los ácidos carboxílicos estuvo por debajo del límite de detección, y los monosacáridos no fueron detectados, alcanzándose la concentración máxima de monosacáridos y disacáridos a aproximadamente 100 horas del proceso de biodegradación.

En la segunda etapa del proceso, a aproximadamente 250 horas del proceso de biodegradación, la concentración de APG disminuye suavemente. Durante esta etapa, tanto la glucosa como los ácidos carboxílicos son hidrolizados a CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O.

### Modelos cinéticos de biodegradación

Las rutas ofrecen una buena explicación de las dos etapas observadas en las curvas de biodegradación primaria (Figura V.3). El modelo cinético de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) fue aplicado para predecir la biodegradación del APG en la etapa A. En este modelo, la tasa de biodegradación viene dada por un polinomio de segundo grado, exclusivamente como una función de la concentración de sustrato (Ecuación V.3).

$$s = \frac{h \cdot (S_0 - q) - q \cdot (S_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}}{(S_0 - q) - q \cdot (S_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}}$$

Ecuación V.3

Donde:

$S_0$ : concentración inicial de sustrato (g/L)

$p$ ,  $q$ , y  $h$ : combinación de los coeficientes de polinomio de segundo grado. Los cuales definen la tasa de consumo de sustrato

$t$ : tiempo (segundos)

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación del modelo de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) explica la dependencia experimental observada (Figura V.8).

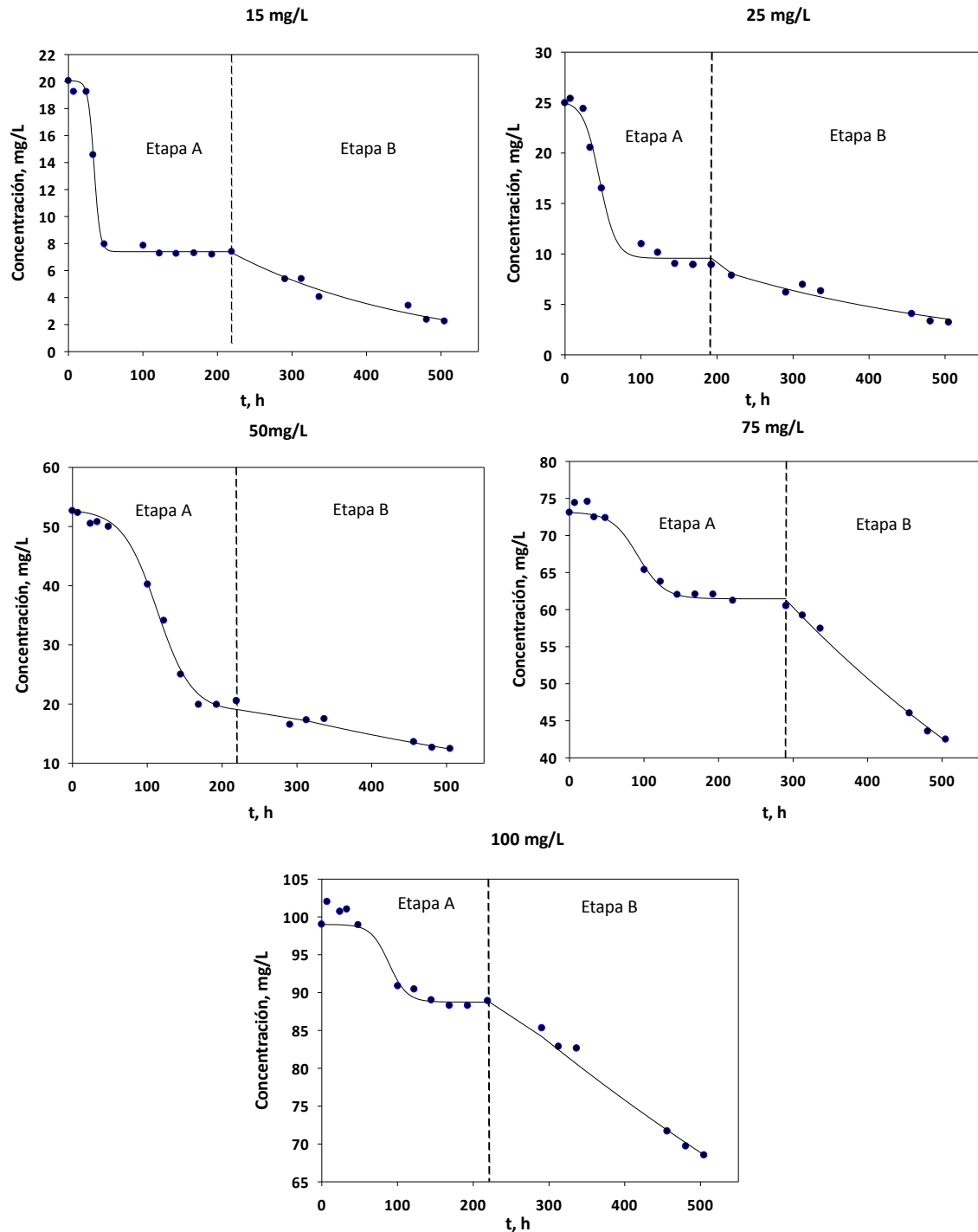


Figura V.8.- Evolución de la concentración de APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> durante el ensayo de biodegradación. La línea continua representa la curva ajustada de acuerdo con el modelo de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) y de primer orden para las etapas A y B respectivamente

Los datos experimentales en la etapa B fueron ajustados a un modelo cinético de primer orden (Zhang, 1999), (Ecuación V.4).

$$\frac{dS}{dt} = K \cdot S$$

Ecuación V.4

Los parámetros cinéticos y coeficientes de correlación encontrados para ambos modelos se recogen en la Tabla V.2.

**Tabla V.2.- Valores de los parámetros del ajuste para la cinética de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) etapa A, y del modelo de primer orden etapa B, para el tensioactivo no iónico APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>**

Modelo	Parámetros cinéticos					Parámetro estadístico
	S <sub>0</sub> , mg/L	h, mg/L	p, h <sup>-1</sup>	q, mg/L	K <sub>1</sub> , h <sup>-1</sup>	r
Quiroga y Sales (Etapa A)	15	20.05	0.25	7.40	-	0.99
	25	25.17	0.09	9.56	-	0.99
	50	52.89	0.042	18.72	-	0.99
	75	73.15	0.056	61.45	-	0.99
	100	99.00	0.084	88.75	-	0.97
Primer orden (Etapa B)	15	-	-	-	0.0040	0.98
	25	-	-	-	0.0029	0.97
	50	-	-	-	0.0017	0.97
	75	-	-	-	0.0016	0.99
	100	-	-	-	0.0010	0.98

S<sub>0</sub>: concentración inicial de sustrato

h: máxima concentración de sustrato que puede ser empleada para la producción de biomasa

p: tasa máxima de crecimiento de microorganismos

q: concentración de sustrato no biodegradable

K<sub>1</sub>: constante cinética de primer orden

### 5.1.1.6 CONCLUSIONES

En el ensayo de biodegradabilidad fácil, más del 88% del alquilpoliglucósido fue degradado después de 21 días; por tanto puede ser considerado como tensioactivo seguro para el medio ambiente. Para el estudio de la influencia de la concentración, se evalúan los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación. El incremento de la concentración del compuesto de 15 a 100 mg/L conlleva una disminución en la velocidad relativa máxima de mineralización y mayores tiempos de latencia, con un factor de aumento de aproximadamente 4.3. El estudio de la biodegradación última muestra una tendencia similar a la biodegradación primaria. La ruta de biodegradación con escisión central en la molécula se confirmó durante los experimentos. Estas rutas confirman lo sugerido en la literatura. Durante el proceso de biodegradación se observaron dos etapas, las cuales están descritas por el modelo de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) en la primera etapa y un modelo cinético de primer orden en la segunda.

### 5.1.1.7 CONCLUSIONS

In the readily biodegradability test, more than 88 % of the APGs were degraded after 21 days; therefore, they are considered completely green surfactants. For the study of the influence of concentration, the parameters characteristics of the biodegradation profiles in the different biodegradation assays were evaluated. Increased in the test-chemicals concentration from 15 to 100 mg/L diminished the relative maximum mineralization rate and boosted the estimated lag times by a factor of approximately 4.3. The study of ultimate biodegradation showed a parallel trend with respect to the primary biodegradation. The central scission pathway of biodegradation was confirmed during the experiments. This pathway agrees with that suggested in the literature. During the biodegradative process,

two different stages were observed, which were better described with the Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) and first-order kinetics models, respectively.

#### 5.1.1.8 REFERENCIAS

- APHA, American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. (1992). Standards methods for the examination of water and wastewater, 18 th ed.; American Public Health Association: Washington, D.C.
- Belanger, S.E., Dorn, P.B., Toy, R., Boeije, G., Marshall, S.J., Wind, T., Van Compernelle, R., Zeller, D. (2006). Aquatic risk assessment of alcohol ethoxylates in North America and Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(1):85-99.
- EEC (1982). Council Directive of 31 March 1982 (82/242/EEC). *Official Journal of the European Union*, L 109, April 22.
- Eichhorn, P., Knepper, T.P. (1999). Investigations on the metabolism of alkyl polyglucosides and their determination in waste water by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 854(1-2):221-232.
- El-Sukkar, M.M.A., Syed, N.A., Aiad, I., Helmy, S.M., El-Azab, W.I.M. (2009). Aqueous solution properties, biodegradability, and antimicrobial activity of some alkylpolyglycosides surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*, 46(5):311-316.
- Federle, T.W., Itrich, N.R. (2006). Fate of free and linear alcohol-ethoxylate-derived fatty alcohols in activated sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(1):30-41.
- García, M.T., Ribosa, I., Campos, E., Sanchez Leal, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere*, 35(3):545-556.
- Hill, K., Von Rybinski, W., Stoll, G. (1997). Alkyl Polyglycosides: Technology, Properties and Applications. VCH, Weinheim.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: Characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10(3):145-153.
- Kühn, A.V., Neubert, R.H.H. (2004). Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharmaceutical Research*, 21(12):2347-2353.
- Organization for the Economic Cooperation and Development. (1993). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Volumen 1, Section 3: Degradation and accumulation. OECD: Paris. France
- Organization for the Economic Cooperation and Development. (2001). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 303 A: Simulation test aerobic sewage treatment. OECD: Paris. France
- Qin, Y., Zhang, G., Zhang, J., Zhao, Y., Zhao, J. (2006). Primary aerobic biodegradation of linear and oxo alcohol alkylpolyglucosides (APG). *Journal of Surfactants and Detergents*, 9(3):227-230.

- Quiroga, J.M., Sales, D. (1991). Surfactant biodegradation in sea water. *Tenside Surfactants Detergents*, 28:200-203.
- Van Compernelle, R., McAvoy, D.C., Sherren, A., Wind, T., Cano, M.L., Belanger, S.E., Dorn, P.B., Kerr, K.M. (2006). Predicting the sorption of fatty alcohols and alcohol ethoxylates to effluent and receiving water solids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(1):61-74.
- Zgoła-Grześkowiak, A., Grześkowiak, T., Frańska, M., Rzasa, A., Łukaszewski, Z. (2008). Investigations on the biodegradation of alkylpolyglucosides by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Biodegradation*, 19(5):635-642.
- Zhang, C., Valsaraj, K.T., Constant, W.D., Roy, D. (1999). Aerobic biodegradation kinetics of four anionic and nonionic surfactants at sub- and supra-critical micelle concentrations (CMCs). *Water Research*, 33(1):115-124.
- Zhang, J., Xie, K.-C., Dai, X.-H., Zhang, G.-Y. (2003). Differences between alkyl polyglucosides of natural alcohol and oxo-alcohol. *Journal of Surfactants and Detergents*, 6(3):253-257.

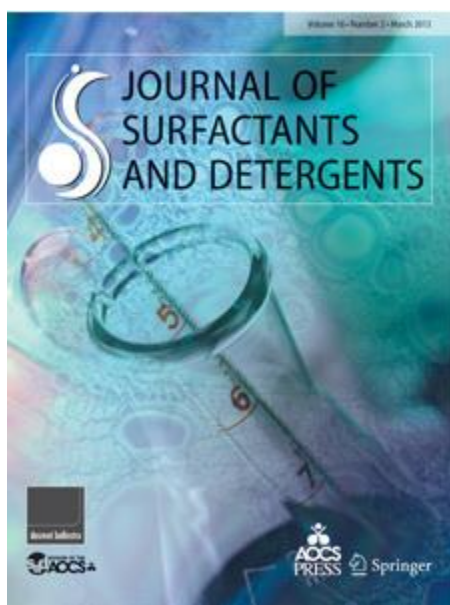
### 5.1.2 Artículo

## Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants

E. Jurado, M. Fernández-Serrano, M. Lechuga, F. Ríos.

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

### Publicado en:



### Journal of Surfactants and Detergents

Editor: Springer Heidelberg

Editor-in-Chief: Jean L. Salager

Tiergartenstrasse 17, D-69121 Heidelberg, Alemania.

Volumen 15, número 1. Páginas 1-7.

Año: 2012

ISSN: 1097-3958

DOI: [10.1007/s11743-011-1278-z](https://doi.org/10.1007/s11743-011-1278-z)





### 5.1.2.1 RESUMEN

En este trabajo se ha investigado la biodegradación última y la toxicidad de tres tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos con diferente cadena alquílica y grado de etoxilación. La biodegradación aerobia última se siguió mediante medidas de carbono orgánico disuelto a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo. Con objeto de comparar los tensioactivos, se determinaron los parámetros característicos del proceso de biodegradación, como tiempo de vida medio, velocidad media de biodegradación y concentración residual de tensioactivo. El aumento de la concentración inicial de tensioactivo provoca la disminución de la mineralización y prolonga el tiempo de vida medio. Los resultados demuestran que la biodegradación aerobia última es mayor para los tensioactivos con cadena alquílica más corta y de mayor grado de etoxilación. Los valores de toxicidad de los tensioactivos, y de sus mezcla binarias, fueron determinados usando tres organismos de prueba, las bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*, los crustáceos de agua dulce, *Daphnia magna*, y las microalgas *Selenastrum capricornutum*. La toxicidad es menor para los tensioactivos de cadena alquílica más corta y mayor grado de etoxilación. También se midió la toxicidad de mezclas binarias de los tres derivados de ácidos alquil éter carboxílicos en proporción 1:1 en peso. La mezcla menos tóxica está formada por los tensioactivos que presentan menor toxicidad individual.

**Palabras clave:** *tensioactivos aniónicos, biodegradabilidad, Daphnia magna, ecotoxicidad, microalgas, Selenastrum capricornutum, Vibrio fischeri*

### 5.1.2.2 ABSTRACT

The ultimate aerobic biodegradability and toxicity of three ether carboxylic derivative surfactants having different alkyl chains and degrees of ethoxylation were investigated. Ultimate aerobic biodegradability was screened by means of dissolved organic carbon determinations at different initial surfactant concentrations. For comparison, the characteristics parameters of the biodegradation process, such as half-life, mean biodegradation rate, and residual surfactant concentration, were determined. Increased surfactant concentrations decreased mineralization and lengthened the estimated half-life. The results demonstrate that the ultimate aerobic biodegradability is higher for the surfactants with the shortest alkyl chain and highest degree of ethoxylation. Toxicity values of the surfactant, and their binary mixtures, were determined using three test organisms, the freshwater crustacean *Daphnia magna*, the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* and the microalgae *Selenastrum capricornutum*. The toxicity is lower for the surfactants with the shortest alkyl chain and highest degree of ethoxylation. The toxicity of binary mixtures of the three ether carboxylic surfactants at a 1:1 weight ratio was also measured. The least toxic mixture is formed by the surfactants having lower individual toxicity.

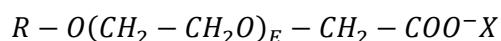
**Keywords:** *anionic surfactants, biodegradability, Daphnia magna, Ecotoxicity, Microalgae, Selenastrum capricornutum, Vibrio fischeri*



### 5.1.2.3 INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son el componente principal de detergentes y productos de limpieza domésticos y comprenden entre el 15 y 40% del total de la formulación detergente (Scheibel, 2004). Los tensioactivos aniónicos constituyen una clase particularmente importante, contabilizando el 60% de la producción global (Aloui, 2009). Muchos de estos compuestos no son biológicamente degradables y representan una amenaza para el medio ambiente (Cain, 1994). El uso masivo de tensioactivos en detergentes y formulaciones cosméticas y su consecuente vertido en los sistemas acuáticos requiere tensioactivos lo más respetuosos con el medio ambiente posible, es decir que sean de baja toxicidad y fácilmente biodegradables. El impacto ambiental de los productos químicos está a menudo determinado por su ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en caso de tensioactivos como resultado de su actividad superficial y su acción perjudicial sobre las membranas biológicas (Steber, 1995). Los tensioactivos se acumulan en el medio ambiente y cada tensioactivo tiene diferente comportamiento. Los tensioactivos no iónicos y catiónicos tienen mayor capacidad de adsorción en suelos y sedimentos que los aniónicos como el lineal alquilbenceno sulfonato (LAS) (Brownawell, 1997; Fytianos, 1998). Muchos tensioactivos pueden ser degradados mediante microorganismos en el medio ambiente aunque algunos otros, como por ejemplo LAS, cloruro de dimetil amonio sebo-dihidrogenado (DTDMAC), y alquilfenoles pueden persistir bajo condiciones anaeróbicas (Scott, 2000; García, 1999; Charles, 1996). Se encontró que el LAS fue degradado en suelos enriquecidos con fangos con una vida media entre 7 y 33 días (Ying, 2006). Muchos tensioactivos no son extremadamente tóxicos para los organismos en concentraciones ambientales habituales y la toxicidad acuática crónica ocurre a concentraciones normalmente superiores a 0.1 mg/L (Lewis, 1991). Se han realizado varios estudios sobre la biodegradabilidad y toxicidad de tensioactivos, la mayoría de ellos relativos a la toxicidad en pequeños crustáceos como *Daphnia magna* (Liwarska-Bizukocj, 2005). Existen numerosos tensioactivos que no son fácilmente biodegradables; por lo que se han desarrollado muchos pretratamientos físico-químicos como ozonización y otras técnicas de oxidación avanzada para eliminarlos (White, 1993). Además, en los últimos años ha existido un énfasis en el desarrollo de tensioactivos no contaminantes y aditivos con el objetivo de mejorar la biodegradabilidad (Yu, 2008). Esta creciente preocupación ha permitido el desarrollo de nuevos tensioactivos, como son los tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos.

Los tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos ensayados en este trabajo son tensioactivos aniónicos, de fórmula general:



donde R es la cadena alquílica, E el grado de etoxilación y X= H<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>. Estos tensioactivos mejoran la calidad de la espuma en el detergente y reducen los niveles de irritación, por ello se usan como co-tensioactivos en formulaciones que van a estar en contacto con la piel. Se comercializan en forma de ácido concentrado.

Se ha investigado la biodegradación aeróbica última de tres de estos tensioactivos con diferente longitud de cadena alquílica y grado de etoxilación. Para continuar avanzando en la investigación sobre la relación entre toxicidad y parámetros estructurales en el campo de los tensioactivos, en este trabajo se han aplicado ensayos de ecotoxicidad con bacterias luminiscentes, microcrustáceos y microalgas a los ácidos alquil éter carboxílicos estudiados.

El propósito de este artículo es encontrar las relaciones entre la biodegradación última y la estructura de los diferentes éteres carboxílicos, así como la influencia de la concentración inicial de tensioactivo. Otro de los objetivos es determinar la toxicidad de los éteres carboxílicos y de sus mezclas binarias (1:1 en peso), para investigar las interacciones toxicológicas entre los tensioactivos, las cuales tienen lugar en los medios naturales, y cómo pueden afectar a la toxicidad de la mezcla, especialmente cuando actúan en sinergismo.

#### 5.1.2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

##### Tensioactivos

Los tensioactivos utilizados en este estudio fueron derivados de ácidos alquil éter carboxílicos suministrados por Kao Corporation® (Tokio, Japón) bajo el nombre comercial AKYPO®, que serán nombrados como EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> (apartado 3.1). El lineal alquilbenceno sulfonato (LAS-R<sub>11-14</sub>) fue suministrado por Petresa S.A (Madrid, España) (apartado 3.1). El resto de reactivos utilizados fueron de calidad química y suministrados por Panreac (Barcelona, España).

##### Medidas de tensión superficial

La CMC de los tensioactivos estudiados se determinó mediante medidas de tensión superficial a diferentes concentraciones siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.

En la Figura V.9 se representan los datos de tensión superficial frente a la concentración para el tensioactivo EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>. Al representar los datos de tensión superficial en un gráfico semilogarítmico se obtiene una caída lineal de la tensión superficial seguido de una meseta. La concentración a la cual se produce el cambio de pendiente corresponde a la concentración micelar crítica (CMC). Los datos de CMC para los tensioactivos estudiados se muestran en la Tabla III.1.

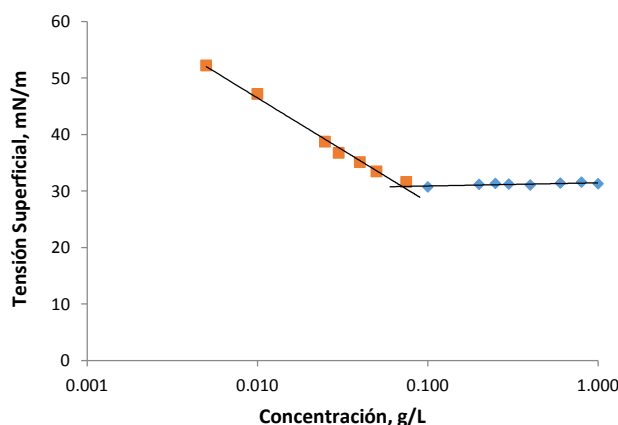


Figura V.9.- Tensión superficial frente a concentración de tensioactivo EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>. Temperatura 25°C

##### Ensayo de biodegradación

El ensayo de biodegradación aerobia fue realizado de acuerdo al ensayo OECD 301 E, según el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1. El seguimiento de la biodegradación se realizó mediante determinaciones de la concentración residual de tensioactivo a través de medidas del carbono orgánico disuelto (apartado 3.4.1.4).

## Ensayos de toxicidad

Se realizaron tres ensayos de toxicidad: el ensayo de toxicidad LumiStox® 300 de inhibición de la intensidad luminosa de bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* (apartado 3.5.1), el ensayo de inmovilización de microcrustáceos de agua dulce *Daphnia magna* (apartado 3.5.2) y el ensayo de inhibición del crecimiento de microalgas *Selenastrum capricornutum* (apartado 3.5.3).

### 5.1.2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Biodegradabilidad de tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos

La biodegradación última de los tensioactivos se ha establecido bajo condiciones aeróbicas en el ensayo de biodegradabilidad fácil OCDE (OCDE, 1993). El seguimiento de la biodegradación se realizó mediante determinaciones de la concentración residual de tensioactivo a través de medidas del carbono orgánico disuelto (COD). Las medidas del COD se hicieron por duplicado para cada muestra. La adsorción puede influenciar significativamente en los efectos medioambientales de los tensioactivos, y este hecho ha sido estudiado por algunos autores (Belanger, 2006; Van Compernelle, 2006). En los ensayos de biodegradación presentados en este trabajo, la adsorción puede considerarse despreciable dada la escasa formación de biomasa. Se realizaron ensayos abióticos en presencia de HgCl<sub>2</sub> para confirmar la adsorción, y se encontró que los valores de concentración residual de tensioactivo permanecen en torno al 100% durante el periodo de biodegradación. Estos resultados indican que la contribución del proceso abiótico en la degradación del tensioactivo puede despreciarse.

La Figura V.10 muestra la evolución de la biodegradación última durante el periodo de biodegradación. Las concentraciones iniciales en el ensayo fueron 25 y 50 mg/L. Para comparar y cuantificar los diferentes ensayos de biodegradación, se evaluaron los siguientes parámetros característicos de los perfiles de biodegradación (Jurado, 2007): tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), velocidad media de biodegradación ( $V_M$ ) y concentración residual de tensioactivo ( $S_R$ ), la cual es calculada a partir de la medida final de COD.  $t_{1/2}$  es el tiempo al que la concentración de sustrato disminuye a la mitad desde el inicio del proceso de biodegradación; se calcula aplicando un procedimiento gráfico al perfil de biodegradación.  $V_M$  es definida como la velocidad media de biodegradación alcanzada hasta lograr el 50 % de biodegradación del tensioactivo y se calcula como el cociente entre un porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo transcurrido para alcanzar ese valor de biodegradación. Este parámetro indica la velocidad con la que transcurre el proceso de biodegradación.

En la Tabla V.3 se muestran los parámetros característicos de los perfiles de biodegradación de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos para todas las concentraciones ensayadas.  $S_0$  es la concentración inicial del ensayo de biodegradación en mg/L y Min es el porcentaje final de biodegradación alcanzado al final del ensayo y calculado con la siguiente ecuación:

$$Min (\%) = \frac{[COD]_i - [COD]_f}{[COD]_i} \cdot 100$$

Ecuación V. 5

donde los subíndices i y f indican inicial y final respectivamente.

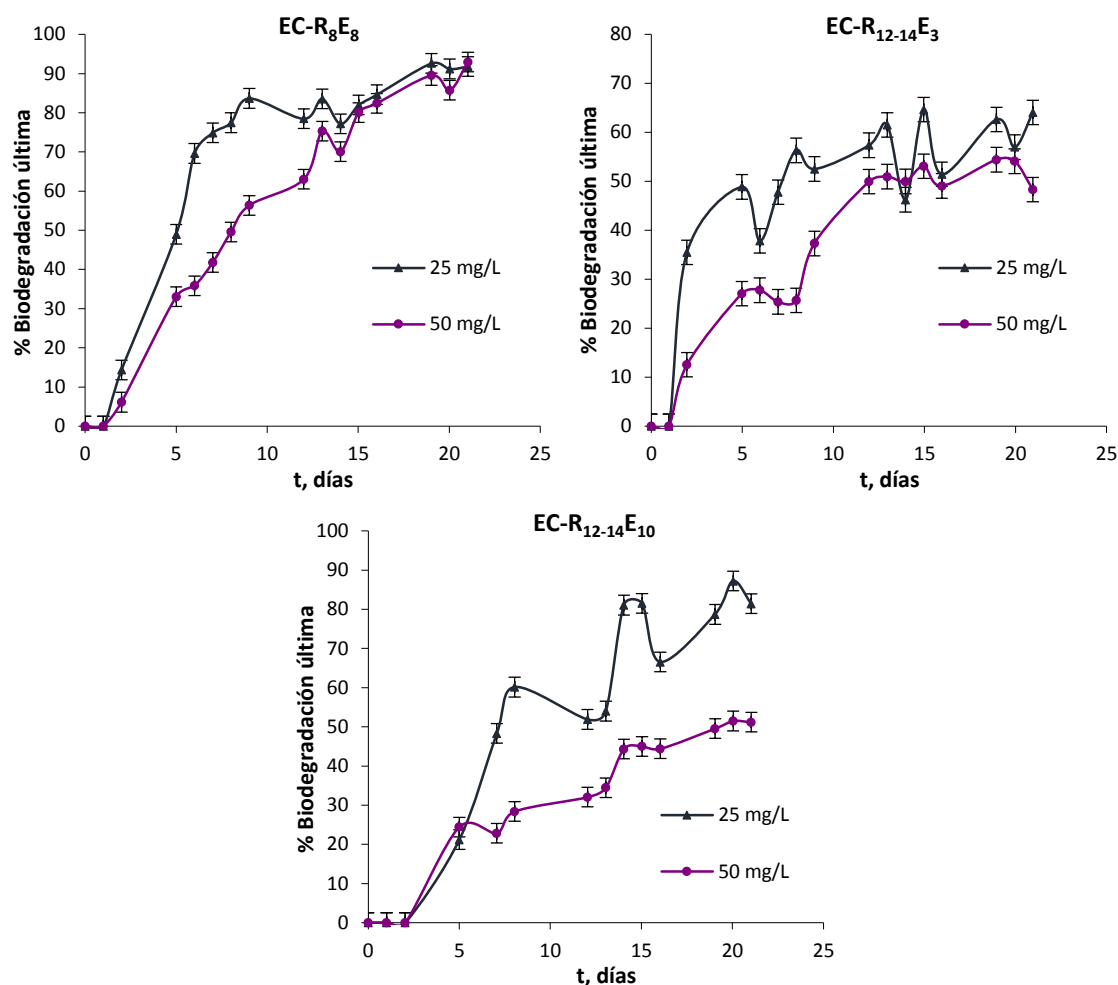


Figura V.10.- Evolución de la biodegradación última durante el periodo de biodegradación.

Tabla V.3.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los tensioactivos derivados de éteres carboxílicos

Tensioactivo	$S_0$ , mg/L	$t_{1/2}$ , días	$V_M$ , %/día	$S_R$ , mg/L	Min, %
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	25	5.11	11.52	2.03	91.88
	50	8.12	6.96	3.20	91.96
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>	25	5.23	12.72	7.38	62.13
	50	7.47	8.64	16.79	52.28
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	25	7.56	6.96	3.42	81.42
	50	19.46	2.40	19.64	51.33

En la Tabla V.3 se presenta un análisis de la influencia de la concentración inicial, donde se refleja que el proceso de biodegradación es más lento cuando la concentración inicial de tensioactivo aumenta, es decir, el tiempo de vida medio aumenta y la velocidad media de biodegradación disminuye. Esto puede ser debido a que los microorganismos necesitan un largo tiempo de adaptación para esos tensioactivos, los cuales generalmente no están incluidos en las formulaciones convencionales de detergentes.

Para EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, la concentración residual de tensioactivo al final del ensayo,  $S_R$ , es notablemente más alta cuando la concentración de tensioactivo es mayor. Sin embargo para EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, el tensioactivo con menor longitud de cadena alquílica y mayor

CMC, la concentración residual de tensioactivo es independiente de la concentración inicial, y el porcentaje de biodegradación aumenta con la concentración inicial.

La legislación actual exige un nivel mínimo de mineralización del 60% cuando se aplica uno de los métodos recogidos en el Anexo III de la Regulación Europea EC n° 648/2004 (EC 648/2004). Si esta condición se cumple, el tensioactivo se considera como biodegradable. Para el tensioactivo EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> se cumple este requerimiento, alcanzando el 91.9 % de eliminación del COD. Los tensioactivos con mayor longitud de cadena alquílica (EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>) cumplen este requisito únicamente cuando la concentración inicial de tensioactivo es 25 mg/L (62.13 y 81.42 % de eliminación de COD respectivamente).

Para analizar la influencia del grado de etoxilación y el tamaño de la cadena alquílica en la biodegradación final, en la Figura V.11 se comparan los resultados para los tres tensioactivos a las concentraciones de 25 y 50 mg/L.

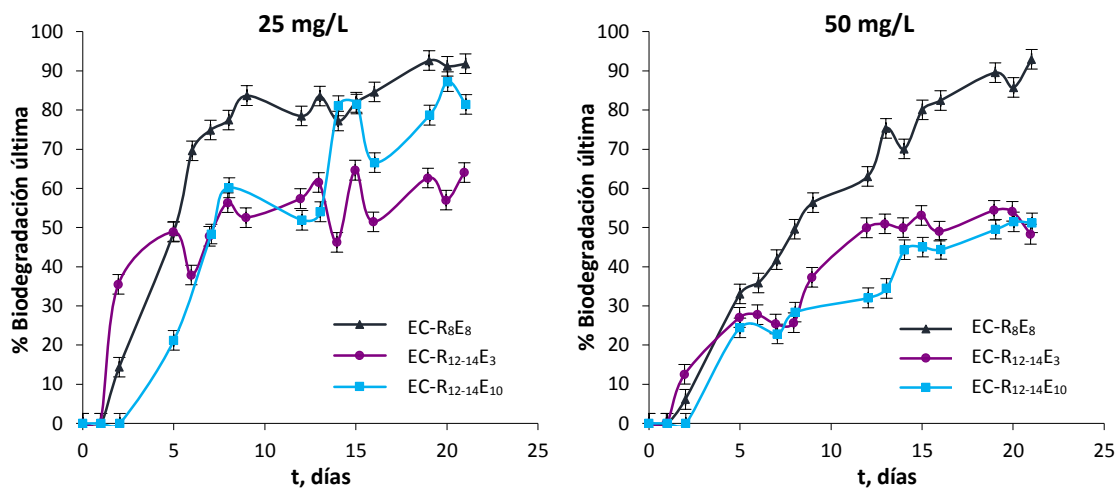


Figura V.11.- Efecto de la estructura del tensioactivo en la biodegradación última

El tensioactivo que alcanza el mayor grado de biodegradación es el EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, es decir el de cadena alquílica más corta. Comparando los tensioactivos con la misma longitud de cadena, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> y diferente grado de etoxilación (3 y 10, respectivamente), no se encontraron diferencias significativas.

### Toxicidad de tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos

Se ha determinado la toxicidad de los tensioactivos derivados ácidos alquil éter carboxílicos y sus mezclas binarias. Los valores de toxicidad se determinaron aplicando el ensayo LumiStox® 300 con bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*, el ensayo de inmovilización de microcrustáceos *Daphnia magna*, y el ensayo de inhibición del crecimiento de microalgas *Selenastrum capricornutum*. Los resultados mostraron que *V. fischeri*, *D. magna* y *S. capricornutum* no utilizan los tensioactivos como fuente de carbono. Por tanto, la concentración de tensioactivo permanece estable durante el periodo de tiempo que dura el ensayo. En la Tabla V.4 se muestran los valores de toxicidad para el ensayo con *V. fischeri*, *D. magna* y *S. capricornutum* con los distintos tensioactivos estudiados.



Tabla V.4.- Valores de toxicidad (95 % IC) para los ensayos con *V. fischeri*, *D. magna* y *S. capricornutum*

Tensioactivo	<i>V. fischeri</i> EC <sub>50</sub> (15 min), mg/L	<i>D. magna</i> IC <sub>50</sub> , mg/L	<i>S. capricornutum</i> EC <sub>50</sub> , mg/L
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>	3.58 (3.19-3.97)	3.74 (2.81-4.14)	7.08 (5.08-9.08)
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	14.18 (11.35-17.02)	18.74 (17.27-20.21)	26.01 (19.38-32.64)
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	134.59 (125.26-143.93)	120.95 (93.35-148.55)	76.26 (64.58-87.67)
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub> + EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	14.96 (9.69-20.23)	8.04 (5.81-10.27)	78.14 (67.62-88.66)
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub> + EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	17.04 (13.50-20.57)	5.04 (4.57-5.51)	29.02 (24.38-33.66)
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub> + EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	54.70 (46.90-62.49)	39.31 (33.34-45.28)	166.57 (149.93-183.21)
LAS-R <sub>11-14</sub>	27.58 (26.26-28.90)	10.09 (9.22-10.96)	151.07 (143.09-159.05)

Los valores de toxicidad aguda van desde 3.58 a 7.08 mg/L para el tensioactivo EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, desde 14.1 a 26.01 para EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> y desde 76.26 a 134.59 mg/L para EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>. De acuerdo con la Directiva Europea nº 67/548/ECC (Directiva 67/548/ECC) con su respectiva enmienda nº 7, los datos anteriormente mencionados permiten asignar al tensioactivo EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> toxicidad de clase II (R51), los cuales son considerados como tóxicos para los organismos acuáticos. Mientras que los tensioactivos EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> y EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> pueden clasificarse como perjudicial (clase III R52) y seguro, respectivamente. De acuerdo con otros trabajos, los tensioactivos aniónicos y no iónicos son tóxicos para varios organismos acuáticos a concentraciones de 0.0025-300 mg/L y 0.3-200 mg/L, respectivamente (Pettersson, 2000).

Por seguridad ecológica, se supone que la concentración teórica calculada de tensioactivo en el medio ambiente debe ser 100 veces menor que los valores de IC<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub> determinados experimentalmente. En este caso, no se puede esperar ningún impacto ambiental por parte de estos tensioactivos. Los resultados de los ensayos de toxicidad son mucho más altos que los encontrados en el medio ambiente (Szwach, 2002).

Los resultados presentados en la Tabla V. 4, muestran que las bacterias *V. fischeri* fueron más sensibles a los efectos tóxicos del tensioactivo que *D. magna* y *S. capricornutum*. La toxicidad es más baja para tensioactivos de cadena alquílica más corta. El grado de etoxilación (E) tiene el efecto contrario: cuanto mayor es el grado de etoxilación menor es la toxicidad.

Los tensioactivos se utilizan habitualmente como co-tensioactivos en las formulaciones detergentes, por ello se han investigado las interacciones toxicológicas de las mezclas binarias de los éteres carboxílicos. Los resultados presentados en la Tabla V.4 muestran que *D. magna* fue más sensible a los efectos tóxicos de las mezclas binarias de los derivados de los éteres carboxílicos que *V. fischeri* y *S. capricornutum*. Las microalgas *S. capricornutum* fueron menos sensibles a los efectos tóxicos de las mezclas binarias que a los de los tensioactivos de forma individual. La mezcla menos tóxica es la formada por los tensioactivos que tienen menor toxicidad individual, es decir por EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>. Estos resultados destacan el efecto sinérgico de estos tensioactivos cuando se encuentran en mezclas.

Comparando la toxicidad de estos tensioactivos con la del típico tensioactivo aniónico LAS-R<sub>11-14</sub>, se puede observar que para *V. fischeri* y *D. magna* los valores de toxicidad son intermedios entre los de los tres éteres carboxílicos estudiados. El ensayo con microalgas *S. capricornutum* indicó que LAS-R<sub>11-14</sub> es el tensioactivo menos tóxico, aunque en la mezcla

binaria entre EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> se produce un efecto sinérgico que hace que la mezcla sea menos tóxica que el LAS-R<sub>11-14</sub>.

### 5.1.2.6 CONCLUSIONES

Los tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos pueden considerarse biodegradables. El de cadena alquílica más corta y de mayor CMC (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>) alcanzó el mayor porcentaje de biodegradación última. La influencia de la concentración inicial de tensioactivo refleja que el proceso de biodegradación es más lento cuando la concentración aumenta, es decir, el tiempo de vida medio aumenta, la velocidad media de biodegradación disminuye y la concentración residual de tensioactivo aumenta notablemente, excepto para EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, para el cual S<sub>R</sub> es independiente de la concentración. Las medidas de toxicidad de los derivados de éteres carboxílicos indicaron que el menos tóxico fue el más biodegradable (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>). Las medidas para las mezclas binarias indicaron que la mezcla menos tóxica es la formada por los tensioactivos de menor toxicidad individual. Además, los resultados con microalgas *S. capricornutum* indican que existió un efecto sinérgico para las mezclas. Estos resultados indican que a bajas concentraciones estos tensioactivos nos son perjudiciales para el medio ambiente.

### 5.1.2.7 CONCLUSIONS

In conclusion, ether carboxylic derivative surfactants can be considered biodegradable. The one with the shortest alkyl chain length and the highest CMC (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>) yielded the highest percentage of mineralization. The influence of the initial concentration reflected that the biodegradation process was slower when the initial concentration increased, i.e., the half-life increased, the mean biodegradation rate decreased, and the residual surfactant concentration was notably augmented, except for EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, for which the S<sub>R</sub> was independent of the initial concentration. The toxicity measurements of these ether carboxylic surfactants indicate that the least toxic was the most biodegradable (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>). Binary mixture measurements indicate that the least toxic mixture was formed by the surfactant having lower individual toxicity. Moreover, the *S. capricornutum* test results indicate that there was synergism in the co-occurrence of these surfactants. The results imply that at low concentrations these surfactants may be considered less damaging to the environment.

### 5.1.2.8 REFERENCIAS

- Aloui, F., Kchaou, S., Sayadi, S. (2009). Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: effect on aerobic biodegradability. *Journal of Hazardous Materials*, 164:353-359.
- Belanger, S., Dorn, P., Toy, R., Boeije, G., Marshall, S., Wind, T., Van Compernelle, R., Zeller, D. (2006). Aquatic risk assessment of alcohol ethoxylates in North America and Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:85-99.
- Brownawell, B.J., Chen, H., Zhang, W., Westall, J.C. (1997). Sorption of non-ionic surfactants on sediment materials. *Environmental Science & Technology*, 31:1735-1741.
- Cain, R.B. (1994). Biodegradation of detergents. *Current Opinion in Biotechnology*, 5:266-274.
- Charles, W., Ho, G., Cord-Ruwisch, R. (1996). Anaerobic biofloculation of wool scouring effluent: the influence of non-ionic surfactants on efficiency. *Water Science and Technology*, 34:1-8.

- EC Regulation (2004). Regulation (EC) No 648/2004 of the European Parliament and the Council of 31 March 2004 on detergents. (DO L 104, 04/08/2004).
- Directiva 67/548/ECC. Council Directive of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances.
- Fytianos, K., Voudrias, E., Papamichali, A. (1998). Behaviour and fate of linear alkylbenzene sulfonate in different soils. *Chemosphere*, 36:2741–2746.
- García, M.T., Campos, E., Sánchez-Leal, J., Ribosa, I. (1999). Effect of the alkyl chain length on the anaerobic biodegradability and toxicity of quaternary ammonium based surfactants. *Chemosphere*, 38:3473–3483.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10:145–153.
- Lewis, M., Wee, V. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Research*, 25:101–113.
- Liwarska-Bizukocj, E., Miksch, K., Malachowska-Jutz, A., Kalka, J. (2005). Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and non-ionic surfactants. *Chemosphere*, 58:1249–1253.
- OECD (1993). Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD guidelines for the testing of chemicals volume 1 Section 3: degradation and accumulation, OECD, Paris, France.
- Pettersson, A., Adamsson, M., Dave, G. (2000). Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere*, 41:1611–1620.
- Scheibel, J. (2004). The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7:319–328.
- Scott, M.J., Jones, M.N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235–251.
- Steber, J., Guhl, W., Steker, N., Schröder, F. (1995). Alkyl polyglycosides – ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside surfactants detergents*, 32:515–521.
- Szwach, I., Hreczvch, W., Fochtman, P. (2002). Comparative evaluation of environmental impact of fatty alcohol ethoxylates and fatty acid methyl ester ethoxylates as nonionic surfactants. In A. Chain (Ed), Proceedings of the 5<sup>th</sup> world conference on detergents: reinventing the industry – opportunities and challenges (pp.163-165), Montreux.
- Van Compernelle, R., McAvoy, D., Sherren, A., Wind, T., Cano, M., Belanger, S., Dorn, P., Kerr, K. (2006). Predicting the sorption of fatty alcohols and alcohol ethoxylates to effluent and receiving water solids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:61–74.
- White, G.F., Russel, N.J. (1993). Biodegradation of anionic surfactants and related molecules. In C. Ratledge (Ed), Biochemistry of microbial degradation (pp. 143-177). Kluwer, Dordrecht.

Ying, G.G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3):417-431.

Yu, Y., Zhao, J., Bayly, A. (2008). Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(4):517-527.



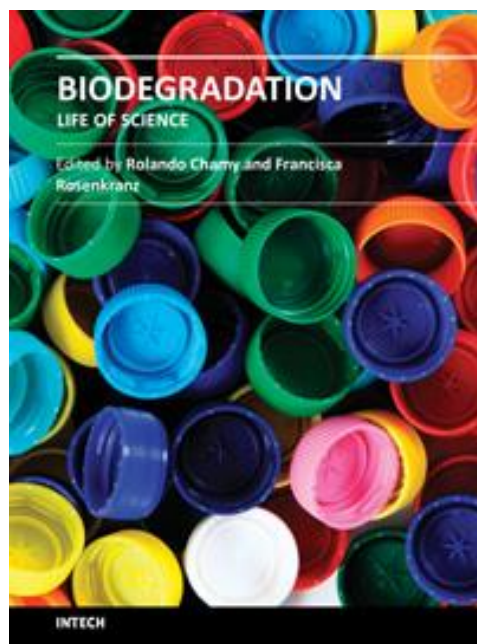
### 5.1.3 Capítulo de Libro

## Aerobic biodegradation of surfactants

E. Jurado, M. Fernández-Serrano, F. Ríos, M. Lechuga

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda.  
Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

#### Publicado en:



#### Biodegradation - Life of Science

Editorial: In-Tech

Editores: Rolando Chamy y Francisca Rosenkranz

Janeza Trdine 9, 51000. Rijeka, Croatia.

Capítulo 3. Páginas 63-81.

Año: 2013

ISBN: 978-953-51-1154-2

DOI: [10.5772/56120](https://doi.org/10.5772/56120)



### 5.1.3.1 INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son un amplio grupo de compuestos químicos los cuales tienen un gran número de aplicaciones debido a sus propiedades de solubilidad, resistencia a la dureza del agua, así como emulsificantes, dispersantes y propiedades humectantes. Poseen una estructura característica, con una o varias cadenas de carbono que forman la parte lipófila de la molécula (o la parte hidrofóbica) y uno o varios grupos polares que forman la parte hidrófila. Estos compuestos, también llamados agentes de superficie, pueden tener diferentes cadenas hidrocarbonadas, grados de insaturación y longitud de cadena, así como diferentes grupos polares, dando lugar a una amplia variedad de tensioactivos con diferentes propiedades.

Los tensioactivos se pueden clasificar como iónicos o no iónicos, dependiendo de la naturaleza de su grupo hidrófilo. Los tensioactivos iónicos se disocian en agua formando iones. En este grupo cabe destacar los ácidos orgánicos, sus sales son tensioactivos aniónicos, mientras que las bases - aminas de diferentes grados de sustitución- y sus sales son tensioactivos catiónicos. Algunos tensioactivos contienen ambos grupos ácidos y básicos, estos tensioactivos pueden comportarse como aniónicos o catiónicos y por eso son llamados anfóteros, o anfóliticos.

Los tensioactivos constituyen un grupo de sustancias cuya principal característica es su acumulación en las interfaces, sólido-líquido o líquido-gas, disminuyendo la tensión superficial del líquido. Esta propiedad hace posible la formación de espuma y la penetración en sólidos como agente humectante, permitiéndoles tener una amplia variedad de aplicaciones (Holmberg, 2001).

Estas sustancias son ampliamente usadas en detergentes de limpieza domésticos, productos de cuidado personal, textiles, pinturas, polímeros, pesticidas, productos farmacéuticos, minería, extracción de petróleo e industria papelería. Los detergentes y cosméticos suponen la principal aplicación de estos compuestos. Tras su uso, el tensioactivo residual y los productos de degradación son vertidos en las plantas de tratamiento de agua residuales o directamente en las aguas superficiales. Muchos de estos compuestos no son biológicamente biodegradables y dependiendo de su concentración, pueden ser perjudiciales para la fauna y flora en aguas superficiales. Los tensioactivos pueden también producir residuos los cuales pueden reaccionar con algunos componentes del agua y generar productos tóxicos y perjudiciales para la salud humana. Por ejemplo, endometriosis y una disminución de la calidad del esperma pueden aparecer como consecuencia (aunque sin confirmar) de la presencia de tensioactivos en el medio ambiente.

Debido a la gran importancia económica de los tensioactivos y su contribución al deterioro del medio ambiente cuando persisten en la naturaleza, es necesario establecer las características estructurales que gobiernan la susceptibilidad de estas moléculas para ser degradadas. El uso masivo mundial de los tensioactivos requiere que sean lo más inocuos posible para el medio ambiente, es decir, de baja toxicidad y fácilmente biodegradables (Jurado, 2009).

Balson y Felix (Balson, 1995) describieron la biodegradación como la destrucción de un producto químico mediante la actividad metabólica de microorganismos. La degradación de tensioactivos a través de la actividad microbiana es la primera transformación que ocurre en el medio ambiente y es un proceso importante en el tratamiento de las aguas residuales. Durante la biodegradación, los microorganismos pueden utilizar los



tensioactivos como sustrato para energía y nutrientes o cometabolizar tensioactivos mediante reacciones metabólicas microbiológicas (Ying, 2006).

El proceso de biodegradación de compuestos orgánicos está afectado por muchos factores, los más importantes son las características fisicoquímicas del compuesto (solubilidad, concentración, estructura, etc.), las condiciones fisicoquímicas del medio ambiente (oxígeno, temperatura, pH, luz, concentración de nutrientes, etc.) y el tipo de microorganismos presentes en el medio acuático. Muchos tensioactivos pueden ser degradados por los microorganismos en el medio ambiente, aunque algunos otros pueden persistir bajo condiciones anaeróbicas (Scott, 2000). Los diferentes tipos de tensioactivos se degradan de forma diferente en el medio ambiente.

Los ensayos de biodegradación pueden usarse para evaluar la biodegradación primaria y última de los tensioactivos aniónicos y no iónicos. La comparación de los diferentes tipos de tensioactivos mediante varios ensayos de biodegradabilidad permite identificar los menos perjudiciales para el medio acuático y determinar la influencia de la estructura de los tensioactivos en el proceso de biodegradación. Sobre esta base, se pueden elegir varios métodos simples para evaluar la biodegradabilidad porque los resultados dependen del ensayo de biodegradación usado. Los ensayos de biodegradación también sirven para la elección de los tensioactivos a incluir en las formulaciones detergentes, teniendo en cuenta su efectividad en el lavado.

En las fórmulas detergentes se utilizan una amplia variedad de tensioactivos. Normalmente se selecciona una mezcla de varios de ellos para encontrar la formulación más apropiada para cada tipo de suciedad. En este capítulo se examina la biodegradación de algunos tensioactivos aniónicos y no iónicos los cuales tienen notables propiedades para el uso en formulaciones detergentes, y que representan unos de los principales grupos de tensioactivos usados hoy en día.

**Tensioactivos no iónicos:** *Alcoholes grasos etoxilados* (FAE), representan uno de los grupos más importantes dentro de los tensioactivos no iónicos. Los alcoholes grasos comerciales generalmente consisten en una mezcla de varios homólogos de distinta longitud de cadena y grado de etoxilación. Son mundialmente utilizados en detergentes domésticos y comerciales, limpiahogares y productos cosméticos. La principal ruta de eliminación de los FAEs es a través del desagüe que los conduce a las plantas de tratamiento de aguas residuales (Wind, 2005). *Nonilfenol polietoxilado* (NPEO), como consecuencia de su resistencia a la biodegradación a bajas temperaturas, y la generación de algunos metabolitos durante el proceso de degradación que son más tóxicos que el compuesto original (Maguire, 1999), el uso de los NPOEs ha sido prohibido en las formulaciones domésticas de algunos países de la unión Europea (Alemania, España y Reino Unido) (EC 53/2003), así como en Suiza y Canadá (Soares, 2006). *Los alquilpoliglucósidos* (APGs) son un grupo de tensioactivos no iónicos en creciente uso. Debido a sus excelentes propiedades espumantes, así como el efecto sinérgico que presentan con otros tensioactivos, son ideales para su uso en lavavajillas, detergentes y otros productos de limpieza (Jurado, 2012). Además su buena tolerancia en la piel les hace adecuados para el uso en productos de cuidado personal (Kunh, 2004). Se preparan a partir de materias primas renovables, almidón/azúcar y aceites vegetales. Como estos compuestos químicos pertenecen a un nuevo tipo de tensioactivos, se han llevado a cabo pocos estudios sobre sus propiedades medioambientales (Jurado, 2011). *Los óxidos de amina* (AO) son un tipo particular de tensioactivos no iónicos que presentan comportamiento catiónico en solución ácida y pueden ser ionizados dependiendo del pH del medio. Presentan buenas propiedades espumantes y son compatibles con la piel (García, 2007). Su consumo se estima en 14,000 toneladas por año en Europa occidental (Merrettig-Bruns, 2003). Son ampliamente

utilizados en detergentes, cosmética, suavizantes y acondicionadores de cabello. Se usan junto con otros tensioactivos debido a que son compatibles con tensioactivos aniónicos y confieren propiedades sinérgicas a las formulaciones detergentes (Cross, 1994; Domingo, 1995).

**Tensioactivos aniónicos:** Los *lineal alquilbencenos sulfonatos (LAS)* suponen el tensioactivo aniónico más utilizado mundialmente. Han sido ampliamente utilizados durante más de 30 años y su consumo en Europa se estima en 430,000 toneladas al año (HERA, 2013). La creciente preocupación sobre la biodegradabilidad y toxicidad de estos compuestos ha promovido el desarrollo de nuevos tensioactivos con mejor comportamiento ambiental (Yu, 2008). Entre ellos se encuentran los *derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (EC)* que se caracterizan porque mejoran las propiedades espumantes y reducen los niveles de irritación, por eso se emplean como co-tensioactivos en formulaciones detergentes que van a estar en contacto con la piel, estos tensioactivos se comercializan en forma ácida.

Para estos tensioactivos, se ha estudiado la biodegradación aerobia utilizando métodos estandarizados en los cuales se usan microorganismos para la degradación de los tensioactivos. Los resultados permiten analizar el comportamiento de los tensioactivos en el medio ambiente o en las plantas de tratamiento de aguas residuales, y así evaluar su biodegradabilidad y decidir sobre la idoneidad para su inclusión en las formulaciones detergentes.

### 5.1.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

#### Tensioactivos no iónicos:

- Alcoholes grasos etoxilados: FAE-R<sub>10</sub>E<sub>3</sub>, FAE-R<sub>10</sub>E<sub>6</sub>, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>4</sub>, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>, FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>6</sub> y FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>11</sub>.
- Nonilfenol polietoxilado: NPOE.
- Alquilpoliglucósidos: Glucopone 215 CS UP (APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>), Glucopone 650 EC (APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>) y Glucopone 600 CS UP (APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>).
- Óxidos de amina: AO-R<sub>14</sub>, AO-R<sub>12</sub> y AO-Cocoamido.

#### Tensioactivos aniónicos:

- Lineal alquilbenceno sulfonato: LAS-R<sub>11-14</sub>.
- Derivados de ácidos alquil éter carboxílicos: EC-R<sub>4-8</sub>E<sub>1-8</sub>, EC-R<sub>6-8</sub>E<sub>3-8</sub>, EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>8</sub>E<sub>5</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.

En el apartado 3.1 se muestran las características de todos los tensioactivos estudiados.

#### Ensayos de biodegradación

Para el estudio y evaluación de la biodegradabilidad de los tensioactivos estudiados se emplearon los siguientes ensayos de biodegradación anteriormente descritos en el Capítulo 3 de detalles experimentales.

- **Ensayo estático de biodegradación:** se desarrolla de acuerdo al ensayo de biodegradabilidad fácil OCDE 301 E (apartado 3.3.1). El seguimiento de la biodegradación primaria se monitorizó mediante medidas de la concentración residual de tensioactivo durante el tiempo que dura el ensayo. Los alcoholes grasos etoxilados y el nonilfenol polietoxilado se determinaron por el método del yodo-yoduro (apartado 3.4.1.2). Los alquilpoliglucósidos se cuantificaron utilizando la modificación del método de la antrona propuesto por Buschmann y Wodarczak (Buschmann, 1995) (apartado 3.4.1.3). El lineal alquilbenceno sulfonato fue

analizado utilizando el método de las sustancias activas al azul de metileno (apartado 3.4.1.1).

El proceso de biodegradación para los óxidos de amina y los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos se monitorizó mediante medidas de la concentración residual de tensioactivos a través de medidas de carbono orgánico disuelto COD (apartado 3.4.1.4).

- **Ensayo dinámico de biodegradación:** se desarrolla de acuerdo al ensayo de biodegradabilidad fácil OCDE 301 E, apartado 3.3.2 (OCDE, 1993). La demanda química de oxígeno (DQO) (apartado 3.4.3.2) y el carbono orgánico disuelto (apartado 3.4.1.4) se midieron diariamente para determinar la eficiencia de biodegradación. La concentración de sólidos en suspensión (apartado 3.4.3.1), la actividad de la deshidrogenasa (DHA)(apartado 3.4.3.3) y la tasa de respiración específica (SOUR) (apartado 3.4.3.4) se determinaron también diariamente para comprobar el correcto funcionamiento del ensayo.
- **Ensayo respirométrico de biodegradación:** el ensayo se realiza utilizando el sistema Oxytop Control® (WTW, Weilheim, Alemania) de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.3.3. El sistema determina los cambios manométricos que ocurren cuando el oxígeno es consumido por los microorganismos para transformar el tensioactivo en CO<sub>2</sub>. Los cambios en la presión son convertidos en medidas de demanda biológica de oxígeno (DBO) y la biodegradación se expresa como DBO/DTO. DTO es la demanda teórica de oxígeno, que es la cantidad de oxígeno requerido para oxidar el tensioactivo completamente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.
- **Ensayo de biodegradación con *Pseudomonas putida*:** Se utiliza la cepa de bacterias *Pseudomonas putida* CECT 234, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). El ensayo se realiza de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.3.4. La eficiencia de la biodegradación se determina usando medidas del carbono orgánico disuelto (apartado 3.4.1.4).

### 5.1.3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Ensayo estático de biodegradación

Este ensayo se aplicó a los óxidos de amina AO-R<sub>14</sub>, AO-R<sub>12</sub>, AO-Cocoamido, a los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos EC-R<sub>6-8</sub>E<sub>3-8</sub>, EC-R<sub>8</sub>E<sub>5</sub>, EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, a los alcoholes grasos etoxilados FAE-R<sub>10</sub>E<sub>3</sub>, FAE-R<sub>10</sub>E<sub>6</sub>, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>4</sub>, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>, FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>6</sub>, FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>11</sub>, a los alquilpoliglucósidos APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>, APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>, APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, al nonilfenol polietoxilado y al lineal alquilbenceno sulfonato LAS-R<sub>11-14</sub>.

Los resultados para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, alcoholes grasos etoxilados, alquilpoliglucósidos, nonilfenol polietoxilado y lineal alquilbenceno sulfonato, muestran que la biodegradabilidad está influenciada por la concentración inicial de tensioactivo, es decir, el grado de biodegradación alcanzado es mayor cuando la concentración inicial de tensioactivo es más baja. Para bajas concentraciones, 15 mg/L y 25 mg/L, se obtienen porcentajes de biodegradación cercanos o superiores al 90%. La legislación actual requiere un nivel mínimo de biodegradación del 80 % para que el tensioactivo pueda considerarse biodegradable cuando se aplica el ensayo de la OCDE. Para los óxidos de amina el efecto de la concentración es inverso, la biodegradación es mayor cuando la concentración inicial de tensioactivo también es mayor.

En la Figura V. 12 se muestra a modo de ejemplo la influencia de la concentración para cada familia de tensioactivos estudiada.

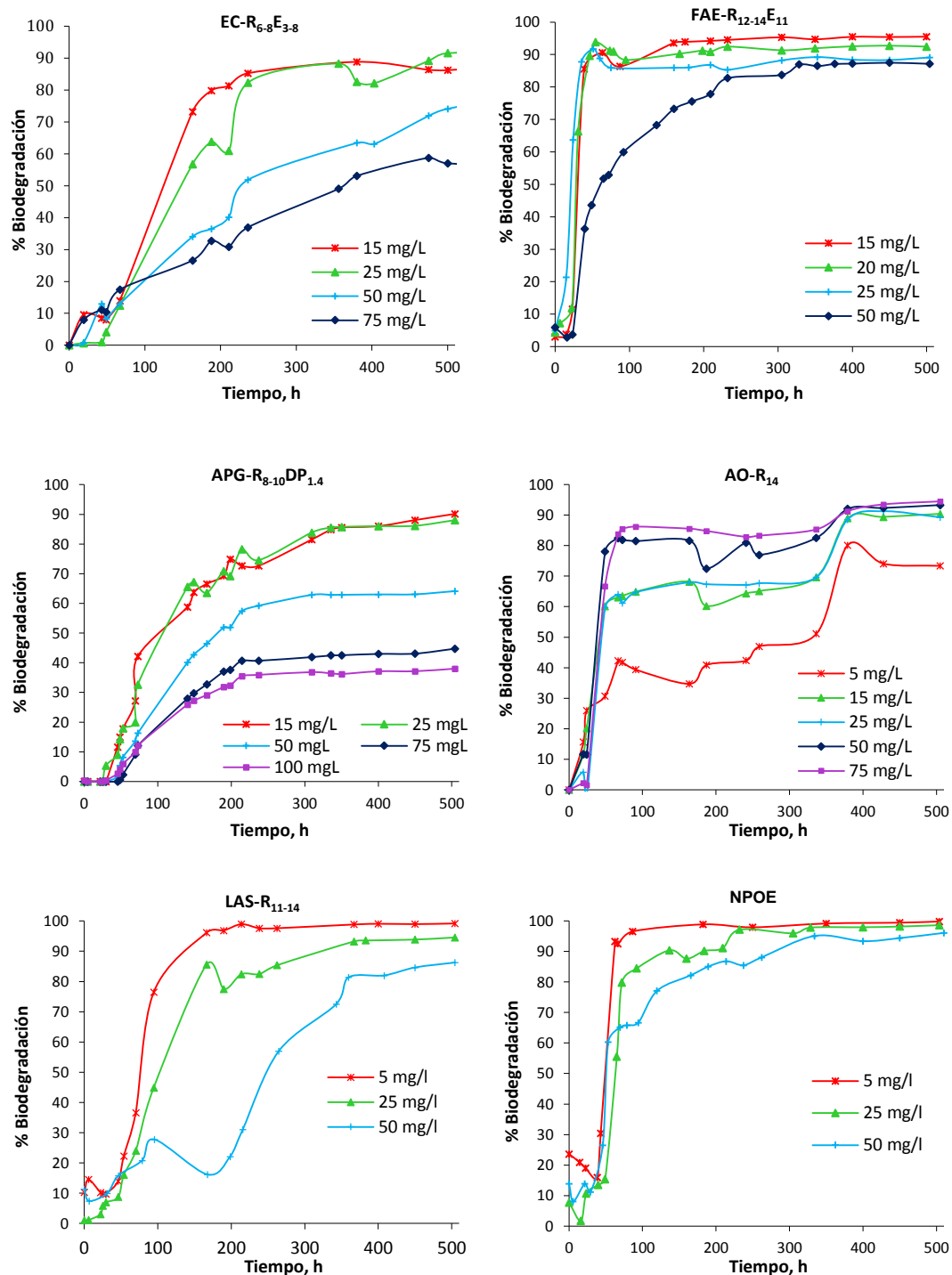


Figura V.12.- Resultados del ensayo estático de biodegradación. Influencia de la concentración inicial

El grado de biodegradación alcanzado por el LAS-R<sub>11-14</sub> y por el NPOE se encuentra entre los más elevados (Figura V.12), pero el NPOE produce subproductos tóxicos (Sherrard, 1994) los cuales son perjudiciales para la salud humana. Este tensioactivo ha sido prohibido en la mayor parte de Europa y Norteamérica (Directiva 2003/53/EC).

El análisis de los resultados del ensayo estático para los alcoholes grasos etoxilados indica que a todas las concentraciones ensayadas, existe una preferencia por la biodegradación de tensioactivos con cadena alquílica más larga y de mayor grado de etoxilación. En la Figura V.13 se muestra la comparación de tres alcoholes grasos etoxilados con diferente longitud de cadena alquílica y grado de etoxilación. Los resultados para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos muestran que la biodegradabilidad es más alta para el tensioactivo de menor longitud de cadena. Para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de misma longitud de cadena, la biodegradabilidad es mayor para los de mayor grado de etoxilación (Figura V.13). Para los óxidos de amina, los resultados indican que el tensioactivo AO-Cocoamido es menos biodegradable que AO-R<sub>14</sub> y AO-R<sub>12</sub>, siendo el AO-R<sub>14</sub> (de mayor longitud de cadena alquílica) el óxido de amina más biodegradable estudiado (Figura V.13). Estos tensioactivos pueden ser considerados fácilmente biodegradables, resultados que están de acuerdo con García y col. (García, 2007), debido a que los tensioactivos basados en óxidos de amina son convertidos en dióxido de carbono, agua y biomasa rápida y fácilmente en condiciones aeróbicas.

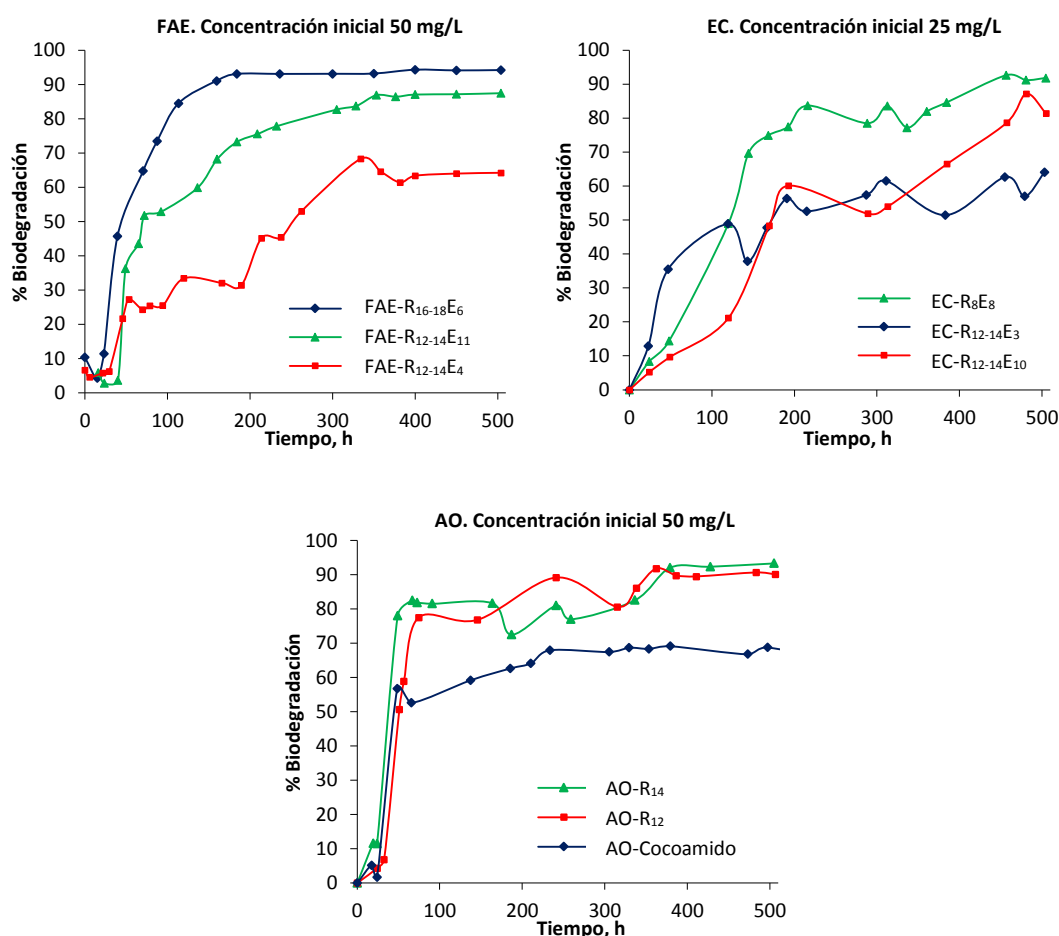


Figura V.13.- Resultados del ensayo estático de biodegradación. Influencia de la longitud de la cadena alquílica y del grado de etoxilación

### Ensayo dinámico de biodegradación

Después del ensayo estático de biodegradación, el ensayo de confirmación se realizó en un periodo de 21 días para los óxidos de amina, AO-R<sub>12</sub>, AO-R<sub>14</sub> y AO-Cocoamido y para dos alcoholes grasos etoxilados, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> y FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>6</sub>. Los resultados muestran que los tensioactivos estudiados pueden ser considerados fácilmente biodegradables debido a

que, después de pocos días desde el inicio, la biodegradación supera el 90% y permanece estable durante los 21 días. En la Figura V.14 se muestra un ejemplo para cada una de las familias de tensioactivos estudiadas. En el caso del alcohol graso etoxilado FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>, se muestra la evolución de la reducción de la demanda química de oxígeno entre el agua residual alimentada y el agua depurada a la salida. Para los óxidos de amina, se muestra para el AO-R<sub>12</sub> la evolución de la mineralización alcanzada a la salida, calculada en base del carbono orgánico disuelto.

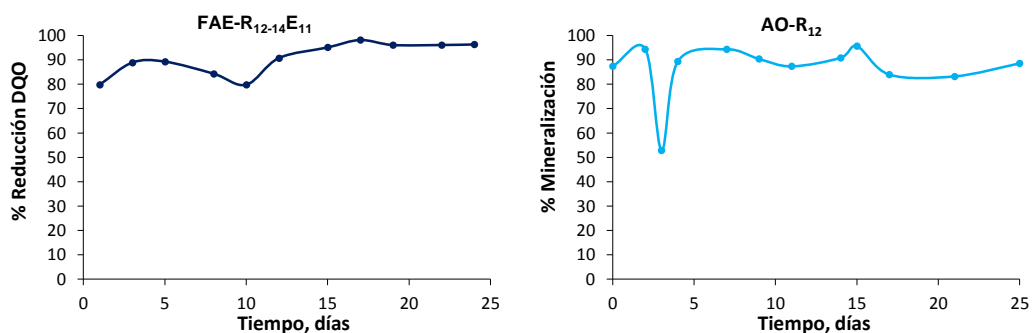


Figura V.14.- Resultados para el ensayo dinámico de biodegradación

### Ensayo respirométrico de biodegradación

El ensayo de respirometría se aplicó a los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, a los alquilpoliglucósidos y a los alcoholes grasos etoxilados.

En este ensayo, a diferencia del ensayo estático, la biodegradación de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos no fue más alta para el tensioactivo con menor longitud de cadena alquílica (Figura V.15). Sin embargo, el tensioactivo con mayor grado de etoxilación fue el más biodegradable, como en el ensayo estático de biodegradación.

En el caso de los alquilpoliglucósidos, la comparación de la biodegradabilidad entre los tres tensioactivos estudiados depende de la concentración inicial. Así, para bajas concentraciones, 15, 25 y 50 mg/L, el más biodegradable fue el APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1,4</sub>, con la cadena alquílica más corta y un número intermedio de unidades de glucosa. Sin embargo, para concentraciones altas, 75 y 100 mg/L, el alquilpoliglucósido más biodegradable fue el APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1,3</sub>, el cual tiene el menor número de unidades de glucosa y una longitud de cadena alquílica media. Cabe destacar que para todas las concentraciones ensayadas, la biodegradabilidad fue más baja para el tensioactivo con la cadena alquílica más larga y mayor número de unidades de glucosa (APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1,5</sub>).

Analizando la influencia de la concentración inicial de tensioactivo, Figura V.16, para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, como en el ensayo estático, los resultados muestran que la biodegradabilidad fue mayor para concentraciones iniciales más bajas. Para los alcoholes grasos etoxilados, el FAE-R<sub>16-18</sub>E<sub>6</sub>, la biodegradación fue más baja para la mayor concentración inicial, pero para la menor concentración de tensioactivo no se obtuvo el mayor porcentaje de biodegradación, como se esperaba.

La influencia de la concentración inicial en el proceso de biodegradación fue la misma para los tres alquilpoliglucósidos ensayados. La biodegradabilidad fue mayor cuando la concentración inicial fue más baja (Figura V.16).

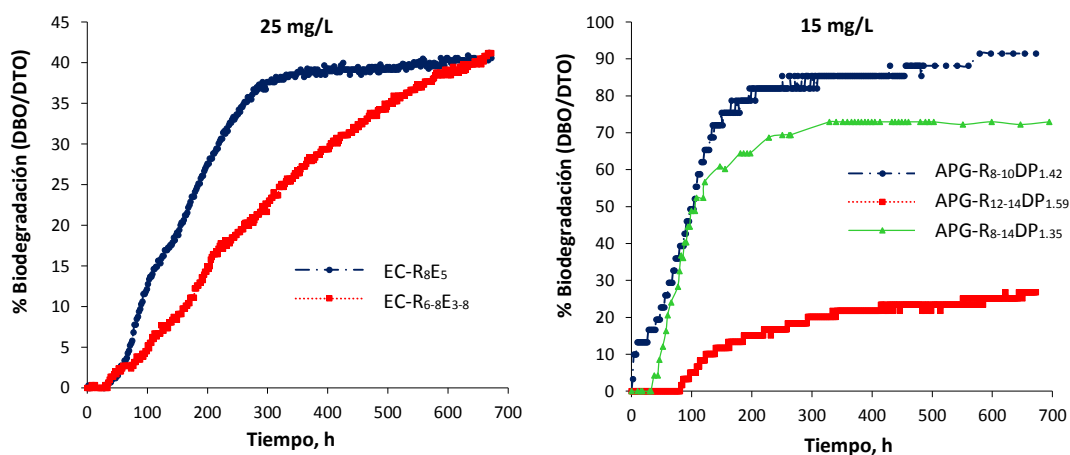


Figura V.15.- Resultados para el ensayo respirométrico de biodegradación. Influencia de la longitud de cadena alquílica, grado de etoxilación y número medio de moléculas de glucosa

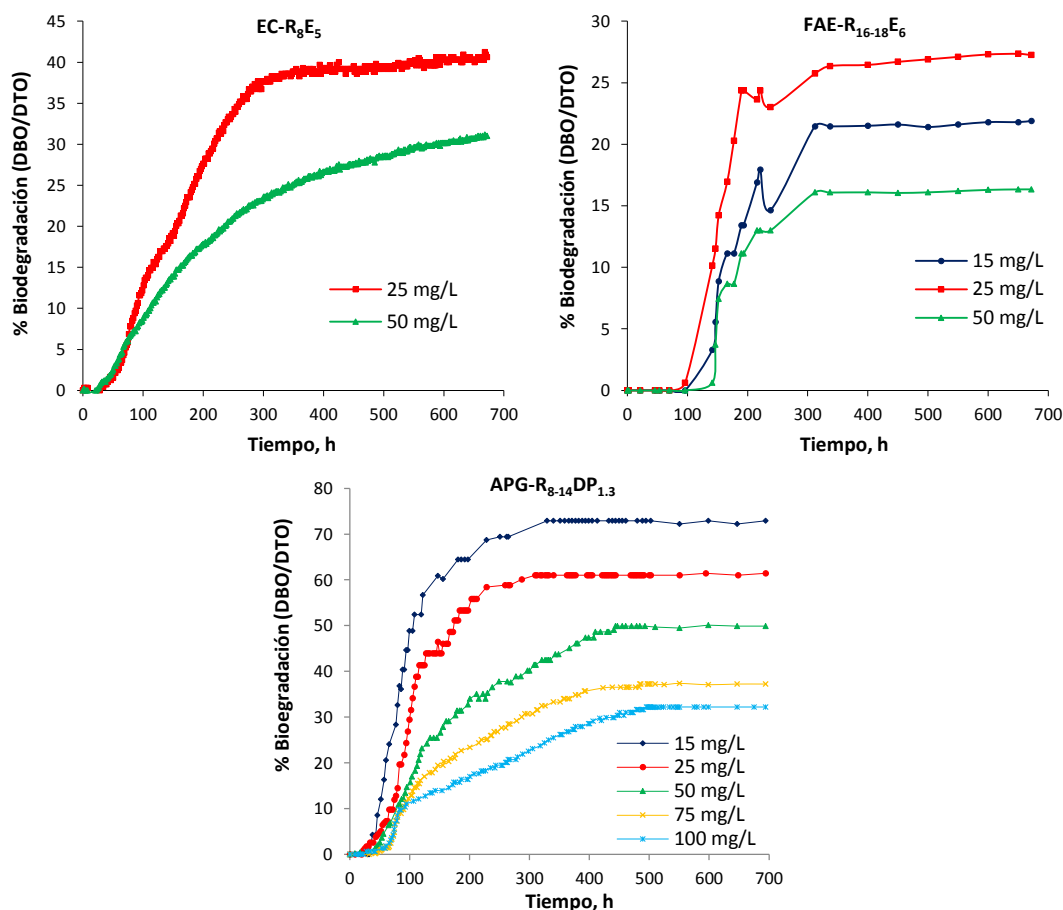


Figura V.16.- Resultados para el ensayo respirométrico de biodegradación. Influencia de la concentración inicial

### Ensayo de biodegradación con *Pseudomonas putida*

Este ensayo se aplicó para los tensioactivos basados en óxidos de amina a diferentes concentraciones iniciales. Este ensayo no proporciona valores de biodegradación comparativos con otros ensayos de biodegradación, pero los resultados pueden ser utilizados para comparar los tensioactivos y en base de esto tomar decisiones relativas a

su uso en las formulaciones detergentes. Los resultados muestran que el tensioactivo AO-Cocoamido es el óxido de amina más biodegradable; este tensioactivo es diferente del resto de óxidos de amina porque incorpora un grupo amino en la cadena alquílica, lo que hace que aumente su carácter hidrófilo (García, 2007). Para los óxidos de amina con la misma estructura pero diferente longitud de cadena alquílica, AO-R<sub>14</sub> y AO-R<sub>12</sub>, la biodegradabilidad fue similar, aunque el AO-R<sub>12</sub>, de cadena más corta, fue ligeramente más biodegradable. En la Figura V. 17 se muestra el resultado para los tres óxidos de amina a 30 mg/L de concentración inicial.

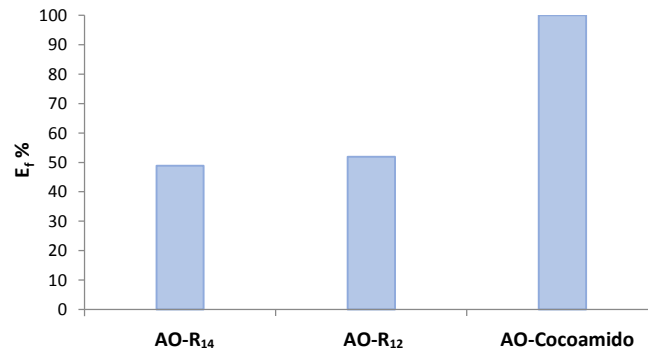


Figura V.17.- Resultados ensayo de biodegradación con *P. putida* a 30 mg/L para los óxidos de amina

El proceso de biodegradación está influenciado por la concentración inicial; la eficiencia de biodegradación es mayor para menores concentraciones de tensioactivo. Esta tendencia es la misma para los tres óxidos de amina estudiados. En la Figura V.18 se muestra la eficiencia de la biodegradación ( $E_f$ ) para AO-R<sub>12</sub> a diferentes concentraciones iniciales.

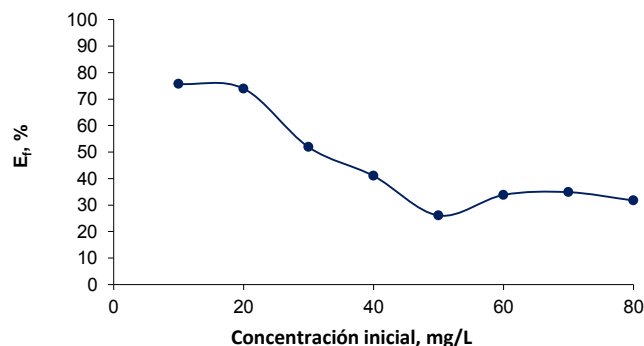


Figura V.18.- Resultados ensayo de biodegradación con *P. putida* para el tensioactivo AO-R<sub>12</sub>. Efecto de la concentración

### Parámetros de biodegradación

Los perfiles de biodegradación resultantes del ensayo estático así como del ensayo de respirometría permiten determinar la cinética del proceso de biodegradación, sirviendo estos para evaluar la persistencia de los tensioactivos en el medio ambiente y para evaluar el riesgo de exposición a los humanos, animales y plantas. Esto también es muy útil para el diseño de plantas industriales y de los equipos necesarios para la eliminación de estos productos.

Usando los perfiles del proceso de biodegradación, podemos definir y evaluar algunos parámetros característicos para la comparación y cuantificación de los ensayos de biodegradación (Jurado, 2007). En este estudio se seleccionaron dos:



- **Tiempo de latencia ( $t_L$ ):** es el tiempo necesario para que los microorganismos no adaptados se aclimaten al nuevo sustrato. El periodo de latencia o aclimatación al proceso de biodegradación de compuestos orgánicos en el medio ambiente puede tener muchas causas, como la falta de nutrientes, inducción enzimática, depredación por protozoos, mutación de las especies, crecimiento de una población microbiana capaz de metabolizar el sustrato, o simplemente la adaptación a la presencia de los agentes tóxicos. Este tiempo corresponde con el periodo durante el cual ocurren cambios leves en la concentración residual. Para el ensayo estático, este parámetro es calculado dibujando dos tangentes a las etapas de adaptación y biodegradación. El tiempo de latencia es el punto de corte entre las dos rectas. Para la respirometría, se calculó como el tiempo necesario para alcanzar un 10% de biodegradación.
- **Velocidad media de biodegradación ( $V_M$ ):** se define como la velocidad hasta alcanzar el 50% de biodegradación y se calcula como el cociente entre el porcentaje de biodegradación alcanzado y el tiempo necesario para alcanzar este valor de biodegradación. Este parámetro indica la velocidad del proceso de biodegradación.

En la Figura V.19 se muestran los tiempos de latencia obtenidos para los tensioactivos estudiados a la concentración inicial de 25 mg/L, tanto para ensayo estático como para el respirométrico.

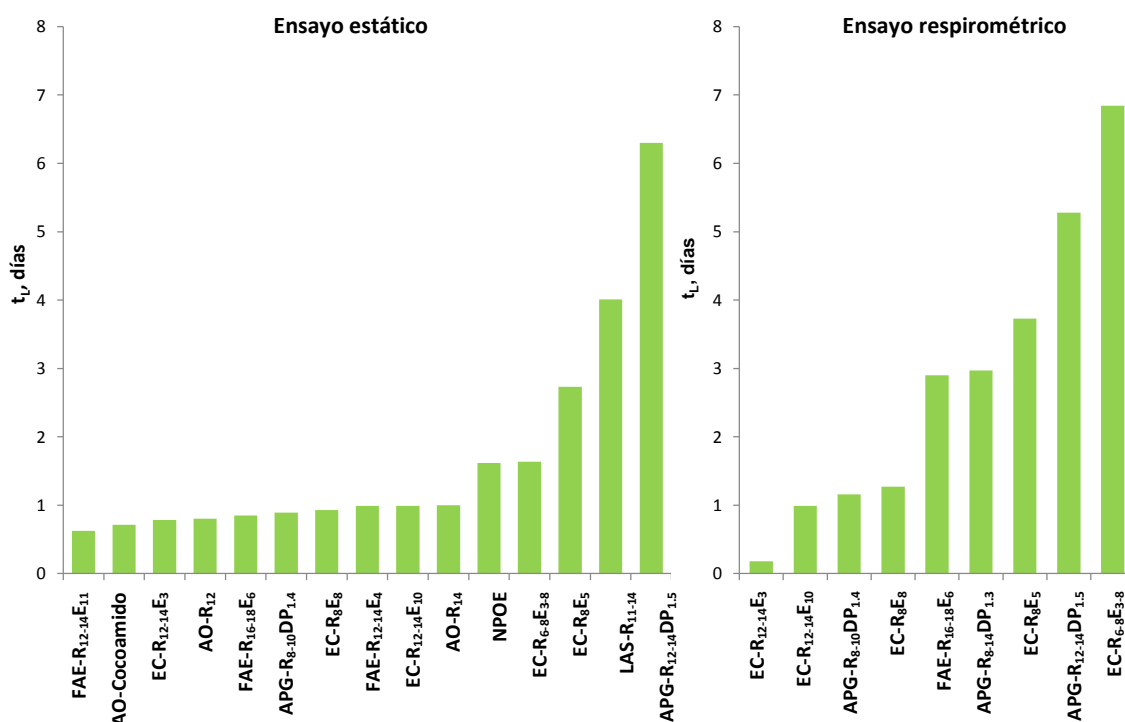


Figura V.19.- Tiempos de latencia para la concentración inicial de 25 mg/L

Los tiempos de latencia obtenidos muestran que el comportamiento de los microorganismos varía considerablemente según el tensioactivo estudiado, así como del ensayo empleado. De acuerdo con los resultados, los microorganismos no adaptados necesitan más tiempo de aclimatación para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> en el caso del ensayo estático y para el EC-R<sub>6-8</sub>E<sub>3-8</sub> cuando se emplea es ensayo respirométrico.

La velocidad media de biodegradación también se evaluó en los casos en los que fue posible. En la Figura V.20 muestra la velocidad media de biodegradación para los

tensioactivos estudiados a la concentración inicial de 25 mg/L, tanto para el ensayo estático como para el respirométrico.

La velocidad media de biodegradación  $V_M$ , permite comparar los procesos de biodegradación de los tensioactivos. De acuerdo con los resultados (Figura V.20), la velocidad media de biodegradación fue más alta para los alcoholes grasos etoxilados mientras que para los derivados de éteres carboxílicos fue la menor en el caso del ensayo estático. Para el ensayo de respirometría los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos registraron los mejores valores y los alquilpoliglucósidos los peores.

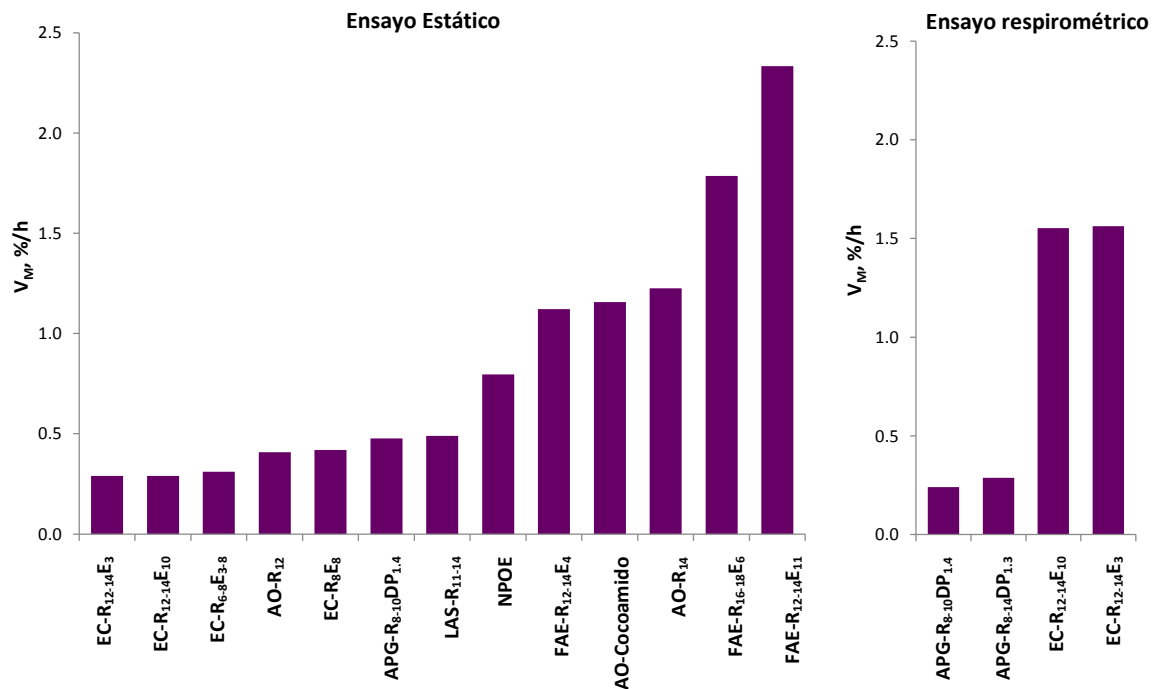


Figura V.20.- Velocidad media de biodegradación para la concentración inicial de 25 mg/L

### Comparación de los ensayos de biodegradación usados

Los resultados de biodegradación y los parámetros de biodegradación para cada familia de tensioactivos pueden variar significativamente dependiendo del ensayo de biodegradación usado. Por lo tanto su comparación es útil para determinar el mejor método para llevar a cabo la biodegradación aeróbica de los tensioactivos. Para esto es importante comprobar qué método representa más exactamente la condiciones del medio ambiente cuando los tensioactivos son vertidos y las ventajas y desventajas cuando cada método es aplicado.

En la Tabla V.5 se muestran las ventajas y desventajas para los diferentes ensayos de biodegradación empleados en este estudio.

En base a estas consideraciones, el ensayo estático y el ensayo respirométrico son los más reproducibles y fáciles de llevar a cabo, y los que proporcionan mayor información.

Tabla V.5.- Ventajas y desventajas de los ensayos de biodegradación aeróbica

Ensayo de Biodegradación	Ventajas	Desventajas
Estático	Fácil de preparar y llevar a cabo Facilidad en el análisis de resultados	Problemas para el análisis a bajas concentraciones de tensioactivo Cada inóculo es diferente Duración: 21 días, lo que implica muchas medidas
Dinámico	Condiciones similares a las de una estación de depuración de aguas residuales	Pérdida de sólidos por flotación Cada lodo es diferente para cada ensayo Duración: más de un mes debido a la fase de adaptación del lodo. Requiere mucho tiempo y experimentación
Respirometría	Fácil de preparar y llevar a cabo Seguimiento automático	
<i>Pseudomonas putida</i>	Rápido, 72h Las bacterias <i>P. putida</i> están presentes en los lodos activados Reproducibilidad Supone un sistema definitivo de vida	Complicaciones para medir el COD a bajas concentraciones, pero no pueden ensayarse concentraciones más altas porque causan inhibición. El inóculo de bacterias aporta COD que interfiere principalmente a bajas concentraciones. Posibilidad de contaminación de la cepa Necesidad de trabajar en condiciones estériles

#### 5.1.3.4 CONCLUSIONES

De acuerdo con los análisis, los resultados de biodegradación dependen del ensayo empleado, los microorganismos utilizados en el ensayo, y la familia de tensioactivos estudiada. Un aspecto importante es la adaptación de los microorganismos al tipo de tensioactivo usado como fuente de carbono.

Teniendo en cuenta los resultados para el ensayo estático, se puede demostrar la influencia de la estructura del tensioactivo en la biodegradabilidad. Con respecto a la longitud de la cadena, el efecto depende de la familia de tensioactivo: para los alcoholes grasos etoxilados y óxidos de amina la biodegradabilidad es mayor cuando la cadena alquílica es más larga, mientras que para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y alquilpoliglucósidos ocurre lo contrario.

Respecto a la influencia de la concentración inicial de tensioactivo, la importancia que este parámetro tiene sobre la biodegradabilidad se ha puesto de manifiesto. Para todos los tensioactivos estudiados, a mayor concentración de tensioactivo la biodegradación es menor, excepto para los óxidos de amina, para los que el efecto es el contrario.

De acuerdo con el parámetro de velocidad media de biodegradación  $V_M$ , de los tensioactivos analizados en este estudio, los alcoholes grasos etoxilados y especialmente el FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> pueden ser considerados como los más biodegradables y los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos los menos biodegradables,

#### 5.1.3.5 CONCLUSIONS

According to the analysis, the biodegradation results depend on the biodegradation test used, the microorganisms used in the test, and the family of the surfactants tested. An

important aspect is the adaptation of the microorganisms to the type of surfactant used as a sole carbon source.

Taking into account the screening test results, we can demonstrate the influence of the surfactant structure on the biodegradability. Regarding the length alkyl chain, the effect depends on the family of surfactant: for the fatty-alcohol ethoxylates and amine-oxide-based surfactants the biodegradability is higher when the alkyl chain is longer, while, for the carboxylic derivative surfactants and alkylpolyglucosides the opposite occurs.

With respect to the influence of the initial surfactant concentration, the importance that this parameter has on the biodegradability has been evidenced. For all the surfactants tested, the greater the initial concentration is, the lower the biodegradability is, except for the amine oxides for which the effect is otherwise.

For the surfactants analyzed in this study, the fatty-alcohol ethoxylates and especially the FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> can be considered the most biodegradable but the carboxylic derivative surfactants the least biodegradable, according to the mean biodegradation rate.

### 5.1.3.6 REFERENCIAS

- Balson, T., Felix, M.S.B. (1995). The biodegradability of non-ionic surfactants. In D.R. Karsa, M.R. Porter (Eds.), *Biodegradability of Surfactants* (pp.204-230). Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Buschmann, N., Kruse, A., Wodarczak, S. (1995). Analytical methods for alkylpolyglucosides. I: Colorimetric Determination. *Tenside Surfactants Detergents*, 32(4): 336-339.
- Cross, J. (1994). Cationic Surfactants. In J. Cross, J. Singer (Eds.), *Analytical and biological evaluation. Surfactant Science Series* (53, pp.140-175). Marcel Dekker, New York.
- Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement).
- Domingo, A. (1995). *A guide to the surfactants world*. Proa, Barcelona.
- European Commission Directive 2003/53/EC. Restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement) Official Journal L 178, 17/07/2003.
- García, M.T., Campos, E., Ribosa, I. (2007). Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere*, 69(10):1574-1578.
- HERA. (2013). LAS. Linear Alkylbenzene Sulphonate. Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products. Revised HERA Report.
- Holmberg, K. (2001). *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. Wiley, Chichester.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Nuñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10:145-153.

- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-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 Science and Technology*, 59:2351-2358.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jimenez, J.L., Ríos, F. (2011). Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation tests. *Water Environment Research*, 83(2):154-161.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jiménez, J.L., Ríos, F. (2012). Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: A comparative study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(2):290-295.
- Kuhn, A.V., Neubert, R.H.H. (2004). Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharmaceutical Research*, 21(12):2347-2352.
- Maguire, R. (1999). Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada*, 34(1):37-78.
- Merrettig-Bruns, U., Jelen, E. (2003). Study on the anaerobic biodegradation of detergent Surfactants. Final Report. Fraunhofer Institute for Environmental, Safety and Energy Technology UMSICHT, Oberhausen.
- ScottM, J., Malcolm, N.J. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235-251.
- Sherrard, K.B., Marriott, P.J., McCormick, M.J., Cotton, R., Smith, G. (1994). Electrospray mass spectrometric analysis and photocatalytic degradation of polyethoxylate surfactants used in wool scouring. *Analytical Chemistry*, 66(20):3394-3399.
- Soares, A., Murto, M., Guieysse, B. (2006). Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5): 597-606.
- Wind, T., Stephenson, R.J., Eadsforth, C.V., Sherren, A., Toy, R. (2005). Determination of the fate of alcohol ethoxylate homologues in a laboratory continuous activated-sludge unit study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(1):42-60.
- Ying, G.G. (2006). Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32:417-431.
- Yu, Y., Zhao, J., Bayly, A. (2008). Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(4):517-527.

## **5.2-. Bloque II: Toxicidad de Tensioactivos**



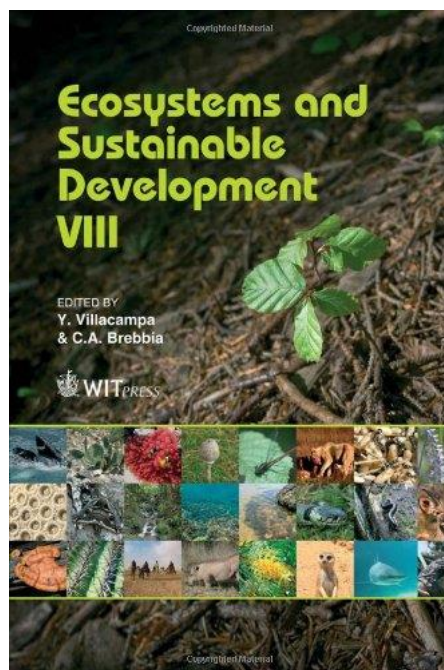
5.2.1 Artículo

## Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®

E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga and F. Ríos

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

Publicado en:



**WIT Transactions on Ecology and the Environment.  
Ecosystems and Sustainable Development VIII.**

Editor: WIT PRESS

Ashurst Lodge, Ashurst, Southampton SO40 7AA.  
United Kingdom

Volumen 144. Páginas 497-505.

Año: 2011

ISSN: 1743-3541

DOI: [10.2495/ECO11043](https://doi.org/10.2495/ECO11043)





### 5.2.1.1 RESUMEN

En este trabajo se han determinado los valores de toxicidad para tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de nombre comercial AKYPO® y para el tensioactivo aniónico lineal alquilbenceno sulfonato (LAS). Para ello se emplearon el ensayo de 24-h inmovilización con *Daphnia magna* (microcrustáceos de agua dulce), el ensayo LumiStox® 300 en el que se emplean bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*, y el ensayo de 72-h de inhibición del crecimiento para microalgas *Selenastrum capricornutum*. Se han estudiado tres AKYPO®, con diferente cadena alquímica y grado de etoxilación (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>) y el LAS-R<sub>11-14</sub>. Para todos los ensayos, los resultados indican que *V. fischeri* es más sensible a los efectos tóxicos de AKYPO® y LAS que *D. magna* y *S. capricornutum*. Los resultados demuestran que la toxicidad es más baja para los AKYPO® con la cadena alquímica más corta y que el tensioactivo aniónico LAS presenta valores de toxicidad intermedios.

**Palabras clave:** tensioactivos aniónicos, ecotoxicidad, AKYPO, *Daphnia magna*, microalgas, *Selenastrum capricornutum*, *Vibrio fischeri*.

### 5.2.1.2 ABSTRACT

In this paper, toxicity values of ether carboxylic derivatives surfactants with commercial name AKYPO®, and the anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS), have been determined by applying the 24-h immobilization test with *Daphnia magna* (freshwater crustacea), the LumiStox® 300 test which employs the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* of the strain *Vibrio fischeri*, and the 72-h algal growth-inhibition test with the Microalgae *Selenastrum capricornutum*, using culture-growth inhibition as the effect criterion. Three AKYPO®, with different alkyl chain and degree of ethoxylation (EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>), and LAS have been tested. For all tests, the results indicated that *V. fischeri* is more sensitive to toxic effects from AKYPO® and LAS than *D. magna* or *S. capricornutum*. The results demonstrate that the toxicity is lower for the AKYPO® with the shortest alkyl chain. The anionic surfactant LAS presents intermediate toxicity values.

**Keywords:** anionic surfactants, ecotoxicity, AKYPO, *Daphnia magna*, microalgae, *Selenastrum capricornutum*, *Vibrio fischeri*.



### 5.2.1.3 INTRODUCCIÓN

El enorme uso global de los tensioactivos en detergentes y formulaciones cosméticas, y su posterior vertido a los sistemas acuáticos, requiere tensioactivos que sean lo más inocuos posible para el medio ambiente, es decir, de baja toxicidad y fácilmente biodegradables. El impacto ambiental de los productos químicos está principalmente determinado por su ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en caso de los tensioactivos debido a su actividad superficial y el resultante perjuicio sobre las membranas biológicas (Steber, 1995). La creciente preocupación medioambiental ha impulsado el desarrollo de nuevos tensioactivos. El carácter anfótero de los tensioactivos aniónicos facilita su acumulación en los organismos vivos así como irritación en piel y ojos. Debido al alto número de tensioactivos en contacto con humanos, se han desarrollado muchos métodos *in vitro* para predecir su efecto sobre la irritación en ojos (Cserhádi, 2002).

Los tensioactivos aniónicos utilizados en esta investigación, la serie AKYPO® de Kao Corporation S.A., mejoran la calidad de la espuma de los detergentes y reducen los niveles de irritación, por eso se utilizan como co-tensioactivos en detergentes que van a estar en contacto con la piel y ojos. Los tensioactivos AKYPO® son derivados de éteres carboxílicos que se comercializan en forma ácida.

El objetivo de este estudio es comparar la ecotoxicidad del tensioactivo aniónico LAS con la de estos nuevos tensioactivos.

Existen muchos tipos de bioensayos válidos para establecer los niveles de toxicidad de los compuestos en organismos acuáticos, pero una gran parte de ellos conllevan mucho tiempo y no son rutinariamente aplicables. Además, el uso de organismos superiores como especies de ensayo puede ser éticamente indeseable. Por tanto existe la necesidad de sustituir los ensayos de toxicidad aguda con peces por otros ensayos más efectivos. Aunque se han descrito muchos bioensayos con microorganismos, la mayoría de los ensayos con bacterias se basan en medidas de luminiscencia, debido a que es una manera rápida, reproducible y simple de usar, no causa problemas éticos y es rentable (Farré, 2001). Características como la velocidad, fiabilidad y normalización de los resultados de toxicidad obtenidos a partir de bioensayos con bacterias luminiscentes los hacen ideales para obtener datos de toxicidad, los cuales pueden ser comparados y estudiados estadísticamente para establecer correlaciones entre toxicidad y estructura química y/o diferentes propiedades de los compuestos ensayados. Los ensayos que emplean bacterias luminiscentes están ganando una amplia 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. Esto explica el hecho de que junto a los ensayos con *Daphnias*, estén aprobados como bioensayos para caracterizar residuos peligrosos, ya que el ensayo con *Daphnia magna* es también un modelo de laboratorio simple y sensible para predecir estudios de toxicidad (Sandbacka, 2000).

De forma general, el uso de los datos de toxicidad se ha extendido a invertebrados y peces, considerándolos más importantes y representativos que los ensayos de toxicidad con productores primarios, siendo los primeros los más sensibles a los tóxicos. Sin embargo, algunos estudios (Rand, 1995) han mostrado que en ciertos casos, las plantas son mucho más sensibles, por ejemplo en ensayos con metales, efluentes industriales, pesticidas, y tensioactivos catiónicos.

Para continuar avanzando en la investigación sobre las relaciones entre toxicidad y parámetros estructurales en el campo de los tensioactivos, en el presente trabajo se han

aplicado los ensayos de ecotoxicidad con bacterias luminescentes, microcrustáceos, y microalgas a diferentes tensioactivos derivados de ácidos alquil éter carboxílicos. La toxicidad de los tensioactivos se ha medido mediante el ensayo LumiStox® de acuerdo a la Norma UNE-EN ISO 11348-2 (UNE-EN-ISO 11348-2), en el que se usan bacterias luminescentes de la cepa *Vibrio fischeri* como organismo de prueba, el ensayo de 24-h de inmovilización de *Daphnia magna* de acuerdo a la Norma UNE-EN-ISO 6341 (UNE-EN-ISO 6341) y usando el ensayo de 72-h inhibición del crecimiento para microalgas *Selenastrum capricornutum*.

Los resultados indican que *V. fischeri* es más sensible a los efectos tóxicos originados por AKYPO® y LAS-R<sub>11-14</sub> que *D. magna* y *S. capricornutum*.

#### 5.2.1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

##### Tensioactivos

Los tensioactivos utilizados en este estudio han sido los tensioactivos comerciales derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de la serie AKYPO® suministrados por KAO Corporation S.A. (Tokio, Japón): AKYPO®LF2, AKYPO®RLM-25 y AKYPO®RLM-100. Con el fin de unificar la nomenclatura con el resto de trabajos publicados estos tensioactivos han sido renombrados como EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> respectivamente (apartado 3.1).

##### Ensayos de toxicidad aguda

Se han realizado tres ensayos de toxicidad: el ensayo LumiStox® 300 en el que se emplean bacterias luminescentes *Vibrio fischeri* (apartado 3.5.1), el ensayo de 24-h inmovilización de microcrustáceos de agua dulce *Daphnia magna* (apartado 3.5.2) y el ensayo de 72-h de inhibición del crecimiento con microalgas *Selenastrum capricornutum* (apartado 3.5.3).

#### 5.2.1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La toxicidad se determinó para los tres AKYPO®. La concentración inicial de tensioactivo estuvo entre 100 y 500 mg/L, dependiendo del tensioactivo ensayado. Para el sistema LumiStox®, los valores iniciales de intensidad luminosa fueron corregidos por un factor que tiene en cuenta la disminución natural de la intensidad luminosa, incluso en ausencia de tóxico.

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

Ecuación V.6

$I_0(0)$  e  $I_t(0)$  representan las lecturas de la intensidad luminosa en el vial de concentración 0 a tiempo 0 y t.

El porcentaje de inhibición (efecto de inhibición) se calcula mediante la siguiente expresión:

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

Ecuación V.7

donde:

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

Ecuación V.8

Con  $\bar{f}_k$  siendo la media del factor de corrección de las muestras de control,  $I_0(c)$  y  $I_t(c)$  las lecturas de la intensidad luminosa en el vial de concentración  $c$  a tiempo 0 y  $t$ .

La función Gamma, la proporción entre la intensidad de luz pérdida por la solución de bacterias y la restante después de la exposición a muestra de tóxico, se puede determinar mediante la ecuación:

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

Ecuación V.9

De los resultados obtenidos, se puede deducir una relación lineal entre la función  $\Gamma$  y la concentración de tensioactivo utilizada, de la siguiente forma:

$$\text{Log}(c) = b \cdot \text{Log } \Gamma + \text{Log}(a)$$

Ecuación V.10

La Figura V.21 muestra un ejemplo de la linealización para EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>. Los valores para EC<sub>20</sub> y EC<sub>50</sub>, expresados en mg/L, son las concentraciones de tensioactivo que inhiben el 20% y 50%, y se calculan dando a  $\Gamma$  los valores de 0.25 y 1 respectivamente. En la Tabla V.6 se muestran los resultados para los tensioactivos estudiados en orden de toxicidad decreciente, para tiempos de incubación de 15 y 30 min.

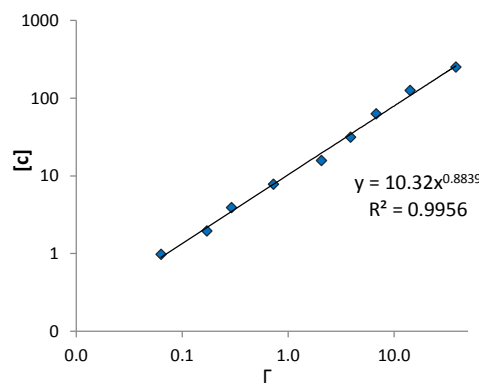


Figura V.21.- Relación lineal entre la función  $\Gamma$  y la concentración de acuerdo a la Ecuación V.10

Tabla V.6.- Datos de toxicidad aguda para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con *V. fischeri*

Tensioactivo	EC <sub>20</sub> , mg/L (15 min)	EC <sub>50</sub> , mg/L (15 min)	EC <sub>20</sub> , mg/L (30 min)	EC <sub>50</sub> , mg/L (30 min)
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>	0.42	3.58	1.90	4.74
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	4.51	14.18	4.39	15.19
LAS-R <sub>11-14</sub>	9.41	27.58	8.29	26.50
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	22.93	134.59	36.44	181.65

Los valores de IC<sub>50</sub> a las 24 horas para el ensayo con *D. magna* se calcularon mediante regresión lineal después de transformar las curvas de dosis-respuesta mediante la transformación logarítmica de la concentración (Figura V.22). En la Tabla V.7 se muestran

en orden decreciente de toxicidad, los valores de IC<sub>50</sub> a las 24 h para el ensayo con *D. magna*, para los tres tensioactivos estudiados.

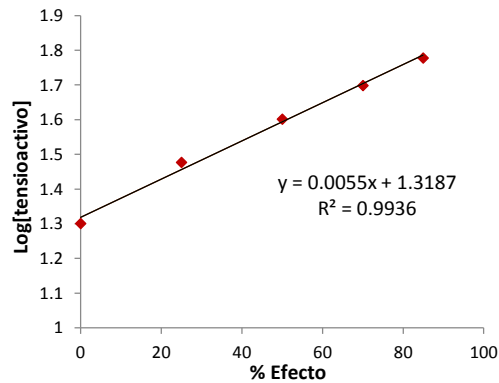


Figura V.22.- Relación lineal entre el % de efecto y la concentración para el ensayo con *D. magna*

Tabla V.7.- Datos de toxicidad aguda para derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con *D. magna*

Tensioactivo	IC <sub>50</sub> , mg/L
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>	3.478
LAS-R <sub>11-14</sub>	10.69
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	18.74
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	120.95

Los valores EC<sub>50</sub> para los ensayos con *S. capricornutum* se calcularon mediante regresión lineal basada en la curvas dosis-respuesta (Figura V.23). La Tabla V.8 muestra en orden decreciente de toxicidad los valores de EC<sub>50</sub> para los ensayos con microalgas *S. capricornutum* realizados para los tres tensioactivos estudiados.

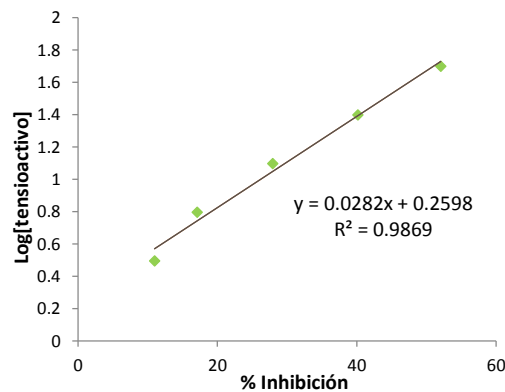


Figura V.23.- Relación lineal entre en % de inhibición y concentración para los ensayos con *S. capricornutum*

Tabla V.8.- Datos de toxicidad aguda para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con *S. capricornutum*

Tensioactivo	EC <sub>50</sub> , mg/L
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub>	7.08
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	26.01
EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub>	76.26
LAS-R <sub>11-14</sub>	151.07

Los datos presentados en las Tablas V.6, V.7 y V.8, y la Figura V.24 muestran que las bacterias *V. fischeri* son más sensibles a los efectos tóxicos de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS que *D. magna* y *S. capricornutum*, como también obtuvo García y col. (García, 1997) para los tensioactivos no iónicos alquilpoliglucósidos.

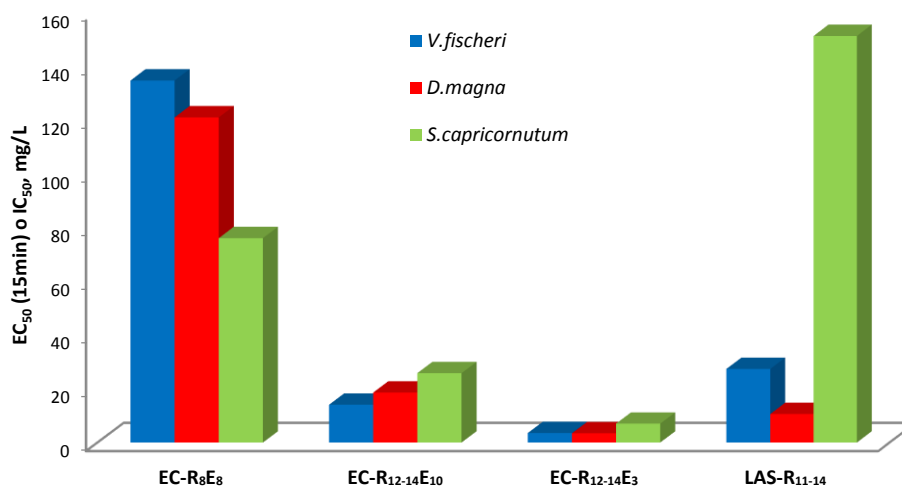


Figura V.24.- Toxicidad para derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS con *V. fischeri*, *D. magna* y *S. capricornutum*

En los resultados obtenidos se puede apreciar que la toxicidad es más baja para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de menor longitud de cadena alquílica. El grado de etoxilación (E) tiene el efecto contrario: cuanto mayor es el grado de etoxilación menor es la toxicidad. La relación entre la toxicidad de LAS- R<sub>11-14</sub> y los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos depende del ensayo empleado. Con las bacterias luminiscentes *V. fischeri*, solo el EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> es menos tóxico que el LAS-R<sub>11-14</sub>. Para *D. magna* EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> son menos tóxicos que el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub>. Sin embargo, para el ensayo con *S. capricornutum*, el LAS- R<sub>11-14</sub> presenta la menor toxicidad. De hecho, como se aprecia en la Figura V.24, es el tensioactivo con los valores de toxicidad más dispersos.

Guilhermino y col. (Guilhermino, 2000) establecieron 0.22 mg/L como el valor límite para los ensayos con *D. magna*. Por tanto, en vista de los resultados (Tabla V.7), todos los tensioactivos estudiados presentan un valor aceptable de toxicidad.

### 5.2.1.6 CONCLUSIONES

Se han determinado los valores de toxicidad para los tres derivados de ácidos alquil éter carboxílicos de nombre comercial AKYPO® y para el bien conocido LAS, usando tres ensayos de toxicidad: el ensayo 24-h de inmovilización para *D. magna*, el LumiStox® 300 con bacterias luminiscentes *V. fischeri* y el ensayo 72-h de inhibición del crecimiento con microalgas *S. capricornutum*. Los resultados obtenidos indican que *V. fischeri* es el más sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos estudiados que *D. magna* y *S. capricornutum*. La influencia de la estructura de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos es de modo que la toxicidad es menor para los de cadena alquílica más corta y de mayor grado de etoxilación. La relación entre la toxicidad del LAS y la de los éteres carboxílicos depende del ensayo realizado, ya que el LAS presenta resultados de toxicidad muy dispersos. De acuerdo con Guilhermino y col. (Guilhermino, 2000) y los resultados obtenidos para *D. magna*, todos los tensioactivos estudiados presentan una toxicidad aceptable.



### 5.2.1.7 CONCLUSIONS

Toxicity values of three ether carboxylic derivatives anionic surfactants with commercial name AKYPO® and the well known anionic surfactant LAS have been determined using three methods: 24-h immobilization test with *D.magna*, the LumiStox®300 test with the luminescent bacterium strain *V. fischeri* and the 72-h algal growth-inhibition test with the Microalgae *S. capricornutum*. The results obtained show that *V. fischeri* is more sensitive to toxic effects from AKYPO® and LAS than *D. magna* and *S. capricornutum*. The influence of AKYPO® structure is in the sense that the toxicity is lower for the AKYPO with the shortest alkyl chain, and the bigger degree of ethoxylation the smaller toxicity. The relation between LAS toxicity with AKYPO® toxicity depends on the test assayed because LAS is the surfactant with the more dispersal toxicity values. However, according with Guilhermino et al. (Guilhermino, 2000) and the results obtained for *D. magna* test, all the surfactants tested present acceptable toxicity.

### 5.2.1.8 REFERENCIAS

- Cserháti, T., Forgács, E., Oros, G. (2002). Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28, 337- 348.
- Farré, M., García, M., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barceló, D. (2001). Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. *Analytica Chimica Acta*, 427 (2), 181-189.
- García, M., Ribosa, I., Campos, E., Sánchez-Leal, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere*, 35 (3), 545-556.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M.C., Soares, A. M. V. M. (2000). Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety Environmental Research Section B*, 46, 357-362.
- Rand, G. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, London.
- Sandbacka, M., Christianson, I., Isomaa B. (2000). The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish - A comparative study. *Toxicology in Vitro*, 14, 61-68.
- Steber, J., Guhl, W., Steker, N., Schröder, F. (1995). Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*, 32 (6), 515-521.

## 5.2.2 Artículo

## Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Microalgae: a comparative study

E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, M. Lechuga, J.L. Jiménez and F. Ríos.

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.

## Publicado en:



### Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Editor: Springer

233 Spring Street, Nueva York, NY 10013. EEUU.

Volumen 88, número 2. Páginas 290-295.

Año: 2012

ISSN: 0007-4861

DOI: [10.1007/s00128-011-0479-5](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0479-5)



### 5.2.2.1 RESUMEN

En este artículo se han determinado los valores de toxicidad para alquilpoliglucósidos aplicando el ensayo de inmovilización de *Daphnia magna*, el ensayo con bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* LumiStox® 300 y el ensayo con algas *Selenastrum capricornutum*. Se han estudiado tres alquilpoliglucósidos con diferente longitud de cadena y grado de polimerización. Para todos los ensayos, los resultados indican que la bacteria *V. fischeri* es más sensible a los efectos tóxicos de los tensioactivos que *D. magna* y *S. capricornutum*. Los resultados demuestran que, independientemente de la especie ensayada, existe una considerable variación de la toxicidad con la estructura para los tensioactivos a base de glucosa. La toxicidad aumenta al disminuir la concentración micelar crítica del tensioactivo, y cuando la longitud de cadena alquílica y por tanto su carácter hidrofóbico aumentan.

**Palabras clave:** alquilpoliglucósidos, tensioactivos no iónicos, toxicidad acuática, evaluación de riesgo

### 5.2.2.2 ABSTRACT

In this paper, toxicity values of alkylpolyglucosides have been determined by applying the 24-h immobilization test with *Daphnia magna*, the LumiStox® 300 test which employs the luminescent bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the test with *Selenastrum capricornutum*. Three alkylpolyglucosides with different alkyl chain and degree of polymerisation have been tested. For all tests, the results indicated that *V. fischeri* was more sensitive to toxic effects from alkylpolyglucosides than was *D. magna* or *S. capricornutum*. The results demonstrate considerable variation in toxicity responses within structurally related glucose-based surfactants regardless of the species tested. The toxicity increased as the critical micelle concentration decreased, and as the alkyl chain length and resultant hydrophobicity increased.

**Keywords:** alkylpolyglucosides, non-ionic surfactants, aquatic toxicity, risk assessment



### 5.2.2.3 INTRODUCCIÓN

Los alquilpoliglucósidos (APGs) pertenecen al grupo de tensioactivos no iónicos y se preparan a partir de materias primas renovables, tales como almidón/azúcar, y aceites vegetales. La Figura V.25 muestra su estructura, con R como la cadena radical de alcohol graso de 8-16 átomos de carbono y DP el número medio de moléculas de glucosa por radical alquílico, que oscilan entre 1 y 2. La principal propiedad de los APGs es que son totalmente compatibles con la piel en condiciones normales de uso, permitiendo su uso solos o como co-tensioactivos en las formulaciones tensioactivas (Messinger, 2007). Sus propiedades los hacen útiles para la aplicación en lavandería, lavavajillas, productos de limpieza, cosméticos y en tecnología alimentaria. Debido a su amplio uso pueden ser potencialmente distribuidos en el medio acuático. La valoración del riesgo ambiental de los tensioactivos es fundamental debido a la enorme cantidad de productos químicos que son generalmente dispersados en los cauces fluviales como componentes de las aguas residuales tratadas (Belanger, 2000).

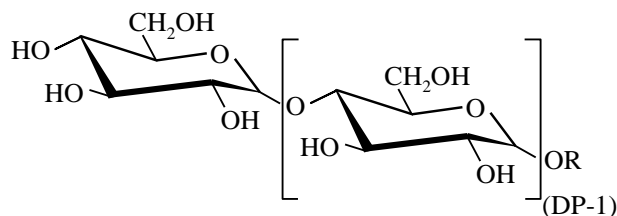


Figura V.25.- Estructura de los alquilpoliglucósidos

Los tensioactivos son unos de los principales componentes en los detergentes y productos de limpieza doméstica, comprenden entre el 15 % y 40% de las formulaciones detergentes (Scheibel, 2004). Tras su uso, los tensioactivos residuales y sus productos de biodegradación son vertidos en las aguas residuales o directamente en aguas superficiales y por tanto dispersados en los diferentes compartimentos ambientales. Debido a su gran y extendido consumo, los tensioactivos y sus productos de biodegradación se han detectado en varias concentraciones en aguas superficiales, sedimentos y fangos (Ying, 2006). Por tanto, los tensioactivos deben ser lo más inocuos posible para el medio ambiente, esto implica baja toxicidad y fácilmente biodegradables. El aspecto más importante para determinar el impacto medioambiental de un producto químico es su ecotoxicidad, la cual es relativamente alta en el caso de tensioactivos debido a su actividad superficial y el efecto negativo que causa en las membranas biológicas (Steber, 1995). La ecotoxicidad de los tensioactivos normalmente aumenta logarítmicamente con un incremento lineal de la longitud de la cadena alquílica (Boeijs, 2006).

Existen muchos tipos de bioensayos válidos para establecer la toxicidad de los compuestos en organismos acuáticos. Estos incluyen organismos de prueba representativos, desde microorganismos, plantas, invertebrados y peces. Muchos de estos ensayos implican mucho tiempo y no son rutinariamente aplicables debido a que no son fáciles de emplear, son caros y sin estrategias analíticas fiables. Además, el uso de organismos superiores como especies de ensayo puede ser también éticamente cuestionable. Por eso existe la necesidad de reemplazar los ensayos de toxicidad aguda en peces por otros ensayos más efectivos. Aunque se han desarrollado muchos bioensayos con microorganismos, la mayoría de los ensayos con bacterias están basados en medidas de luminiscencia debido a que es una manera rápida, reproducible y simple de usar, no causa problemas éticos, y es rentable (Farré, 2001). Características como la velocidad, fiabilidad y normalización de los resultados de toxicidad obtenidos a partir de bioensayos con bacterias luminiscentes

los hacen ideales para obtener datos de toxicidad, los cuales pueden ser comparados y estudiados estadísticamente, para establecer correlaciones entre toxicidad y estructura química y/o diferentes propiedades de los compuestos ensayados. Los ensayos con bacterias luminiscentes están ganando una amplia aceptación para la rápida y simple determinación de la toxicidad de compuestos químicos en aguas superficiales y residuales, así como en extractos de matrices sólidas. Esto explica el hecho de que junto a los ensayos con *Daphnias*, estén aprobados como bioensayos para caracterizar residuos peligrosos, ya que el ensayo con *Daphnia magna*, es también un modelo de laboratorio simple y sensible para realizar estudios de toxicidad (Sandbacka, 2000).

Este trabajo se realizó con objeto de avanzar en el estudio de las relaciones entre la toxicidad y los parámetros estructurales en el campo de los tensioactivos, aplicando ensayos de toxicidad con bacterias luminiscentes, microcrustáceos, y microalgas para diferentes alquilpoliglucósidos. El estudio de toxicidad con diferentes organismos es también útil para identificar el organismo más sensible a los efectos tóxicos, y por tanto para que se puedan establecer límites de concentración de tensioactivos en aguas superficiales. Por otra parte, la relación estructura-toxicidad es útil para elegir el tensioactivo más adecuado en las formulaciones detergentes.

#### 5.2.2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Los tensioactivos utilizados son los alquilpoliglucósidos comerciales: Glucopone 215 CS UP, Glucopone 650 EC y Glucopone 600 CS UP suministrados por Henkel-Cognis (Düsseldorf, Alemania). Con el fin de unificar la nomenclatura con el resto de trabajos publicados estos tensioactivos han sido renombrados como APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>, APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>, APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y respectivamente (apartado 3.1).

Se emplearon tres ensayos de toxicidad: el ensayo con bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri* LumiStox® 300 (apartado 3.5.1), el ensayo de inmovilización de *Daphnia magna* (apartado 3.5.2), y el ensayo de inhibición del crecimiento con microalgas *Selenastrum capricornutum* (apartado 3.5.3).

#### 5.2.2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración nominal y actual del tensioactivo en los ensayos de toxicidad se muestra en la Tabla V.9.

Tabla V.9.- Concentración nominal y actual de tensioactivo en los ensayos de toxicidad

Tensioactivo	<i>V. fischeri</i>	<i>D. magna</i>	<i>S. capricornutum</i>
Concentración nominal en mg/L			
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	50	200	1500
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	50	100	100
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	50	60	100
Concentración actual (95% IC) en mg/L			
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	t=0; c= 49 (±1.8)	t=0; c= 170 (±3.8)	t=0; c= 1140 (±21)
	t=30 min; c= 51(±0.9)	t=24 h; c= 173 (±1.9)	t=72 h; c= 1160 (±115)
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	t=0; c= 51(±1.3)	t=0; c= 92 (±8.3)	t=0; c= 66 (±4.7)
	t=30 min; c= 52(±2.1)	t=24 h; c= 83 (±2.9)	t=72 h; c= 77(±0.9)
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	t=0; c=50 (±0.9)	t=0; c= 52 (±2.3)	t=0; c= 107 (±1.8)
	t=30 min; c= 51(±1.7)	t=24 h; c=52 (±1.1)	t=72 h; c= 103 (±2.3)

La concentración de tensioactivo en el bioensayo acuático al inicio y final del ensayo se midió usando el método de la antrona (Buschmann, 1995) (apartado 3.4.1.3). El objetivo de esta medida es asegurar que los organismos de prueba no usan el tensioactivo como

fuelle de carbono y que la adsorción en el material de vidrio, adsorción a los organismos de prueba y la biodegradación de los materiales usados es despreciable durante el periodo que dura el ensayo. Las medidas de concentración efectuadas están muy cerca de las concentraciones nominales en el ensayo con *V. fischeri* (Tabla V.9). La mayor desviación entre concentración nominal y medida fue para el APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, para el cual se encuentra una diferencia del 34 % en el ensayo con *S. capricornutum* a tiempo cero. Para el cálculo de EC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> se utilizaron los valores de concentración nominal.

Para el sistema LumiStox®, los valores iniciales de intensidad luminosa se corrigieron con un factor que tiene en cuenta la disminución natural de la intensidad luminosa, incluso en ausencia de tóxico.

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

Ecuación V.11

I<sub>0</sub>(0) e I<sub>t</sub>(0) representan las lecturas de la intensidad luminosa en el vial de concentración 0 a tiempo 0 y t.

El porcentaje de inhibición (efecto de inhibición) se calculó con la expresión:

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

Ecuación V.12

donde

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

Ecuación V.13

Con  $\bar{f}_k$  siendo la media del factor de corrección de las muestras de control, I<sub>0</sub>(c) y I<sub>t</sub>(c) las lecturas de la intensidad luminosa en el vial de concentración c a tiempo 0 y t.

La función Gamma, la proporción entre la intensidad de luz perdida por la solución de bacterias y la restante después de la exposición a muestra de tóxico, puede determinarse por medio de la ecuación:

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

Ecuación V.14

De los resultados obtenidos, se puede deducir una relación lineal entre la función  $\Gamma$  y la concentración de tensioactivo usada, de la siguiente forma:

$$\text{Log}(c) = b \cdot \text{Log } \Gamma + \text{Log}(a)$$

Ecuación V.15

En la Figura V.26 se muestra un ejemplo de la relación lineal para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub>.



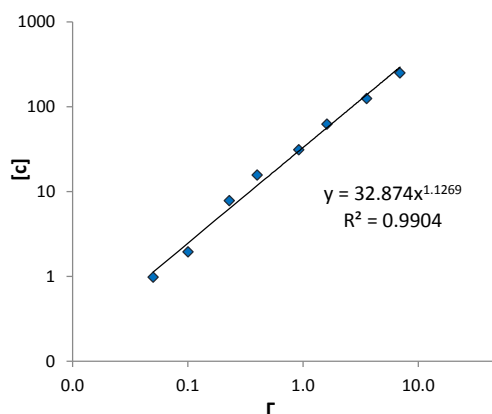


Figura V.26.- Relación lineal entre la función  $\Gamma$  y la concentración de acuerdo a la Ecuación V.15

Los valores para  $EC_{20}$  y  $EC_{50}$ , expresados en mg/L, son las concentraciones de tensioactivo que inhiben el 20% y 50%, y se calculan dando a  $\Gamma$  los valores de 0.25 y 1 respectivamente. En la Tabla V.10 se muestran los resultados para los tensioactivos estudiados en orden de toxicidad decreciente, para tiempos de incubación de 15 y 30 min.

Tabla V.10.- Datos de toxicidad aguda (95% IC) para alquilpoliglucósidos en el ensayo con bacterias *V. fischeri*

Tensioactivo	$EC_{20}$ , mg/L (15 min)	$EC_{50}$ , mg/L (15 min)	$EC_{20}$ , mg/L (30 min)	$EC_{50}$ , mg/L (30 min)
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	3.9 ( $\pm 0.2$ )	14 ( $\pm 0.8$ )	4 ( $\pm 0.7$ )	14 ( $\pm 0.6$ )
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	7.5 ( $\pm 0.8$ )	13 ( $\pm 0.7$ )	7.3 ( $\pm 1$ )	20 ( $\pm 0.7$ )
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	10 ( $\pm 1$ )	29 ( $\pm 0.9$ )	6.2 ( $\pm 0.9$ )	25 ( $\pm 0.4$ )

Para el ensayo con *D. magna* se calcularon los valores de  $IC_{50}$  a las 24 horas mediante regresión lineal, después de obtener las curvas de dosis-respuesta mediante la transformación logarítmica de la concentración (Figura V.27). En la Tabla V.11 se muestran en orden decreciente de toxicidad, los valores de  $IC_{50}$  a las 24 h para el ensayo con *D. magna*, para los tres tensioactivos estudiados. Las menores concentraciones ensayadas que inmovilizaron todas las *D. magna* y las mayores concentraciones que no inmovilizaron a ninguna también se muestran en la Tabla V.11.

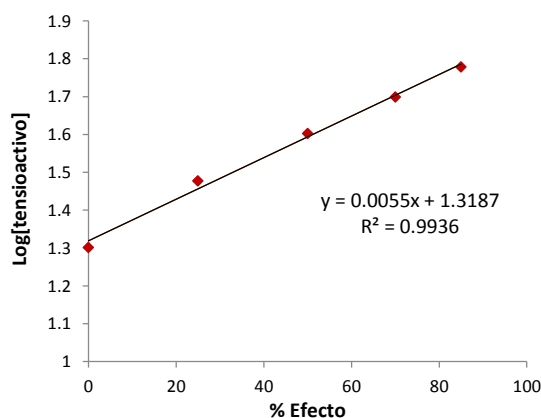
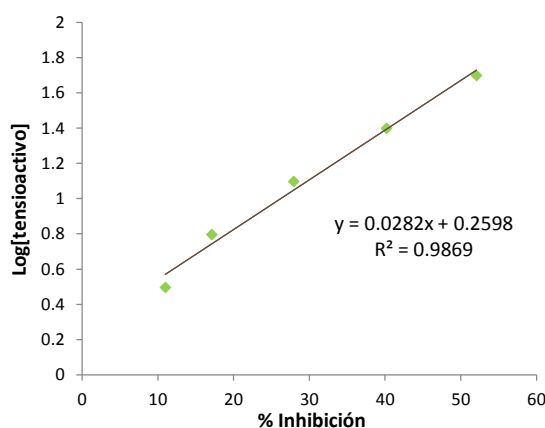


Figura V.27.- Relación lineal entre el % de efecto y la concentración para los ensayos con *D. magna*

Tabla V.11.- Datos de toxicidad aguda para alquilpoliglucósidos para el ensayo con *D. magna*

Tensioactivo	IC <sub>50</sub> , mg/L	Concentración más pequeña que inmoviliza todas las <i>D. magna</i> (mg/L)	Concentración más alta que no inmoviliza ninguna <i>D. magna</i> (mg/L)
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	29 (±2.4)	85	10
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	14 (±1.3)	65	5
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	111 (±1.2)	192	70

Los valores EC<sub>50</sub> para los ensayos con microalgas *S. capricornutum* se calcularon mediante regresión lineal basada en la curvas dosis-respuesta (Figura V.28). La Tabla V.12 muestra en orden decreciente de toxicidad los valores de EC<sub>50</sub> para los ensayos con *S. capricornutum* realizados para los tres tensioactivos estudiados.

Figura V.28.- Relación lineal entre en % de inhibición y concentración para los ensayos con *S. capricornutum*Tabla V.12.- Datos de toxicidad aguda (95 % CI) para alquilpoliglucósidos en los ensayos con *S. capricornutum*

Tensioactivo	EC <sub>50</sub> , mg/L
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	46 (±7.5)
APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	81 (±7)
APG-R <sub>8-10</sub> DP <sub>1.4</sub>	1110 (±28)

Los resultados presentados en las Tablas V.10, V.11 y V.12 y la Figura V.29 muestran que las bacterias *V. fischeri* fueron más sensibles a los efectos tóxicos del tensioactivo que *D. magna* y *S. capricornutum*. En la literatura se encuentran resultados similares. Por ejemplo, García y col. (García, 1997) realizaron ensayos de toxicidad con *D. magna* y bacterias luminiscentes para tres alquilpoliglucósidos (con longitud de cadena alquílica entre R<sub>8</sub>-R<sub>16</sub> y grado de polimerización DP 1.3-1.4, y encontraron que las bacterias luminiscentes fueron más sensibles que *D. magna* a los efectos tóxicos de APGs. Sin embargo, en literatura también se encuentran resultados contradictorios. Li y Schröder (Li, 2000) encontraron que *D. magna* fue más sensible que *V. fischeri* a los efectos tóxicos de tensioactivos, aunque estos autores muestran resultados globales para alquilpoliglucósidos y no indican las condiciones de los ensayos. Nuestros resultados indican que aunque *V. fischeri* fue el organismo más sensible también es el menos discriminativo. Por tanto, una serie de ensayos de toxicidad incluyendo especies como *D. magna* y *S. capricornutum* pueden ser adecuados para evaluar la toxicidad relativa de diferentes tensioactivos.

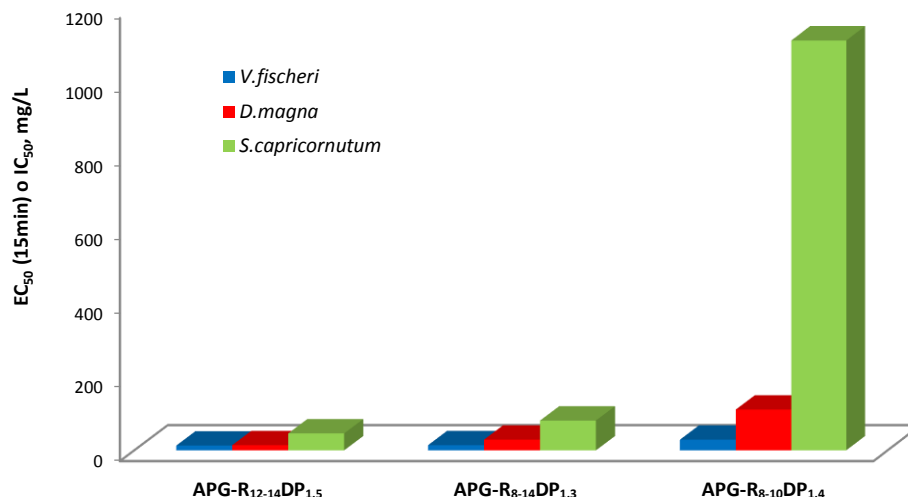


Figura V.29.- Datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos usando *V. fischeri*, *D. magna* y *S. capricornutum*

En el grupo de tensioactivos con esta cadena alquílica, los alquilpoliglucósidos tienen toxicidad acuática favorable para peces, bacterias, algas etc. (Willing, 2004). El nonilfenol etoxilado (NPOE) y el lineal alquilbenzeno sulfonato (LAS) mostraron mayores valores de toxicidad que los alquilpoliglucósidos usando *D. magna* y *V. fischeri* (Lewis, 1991), aunque más recientemente algunos investigadores indicaron que esa clasificación como respetuosos con el medio ambiente es ligeramente tóxica, pero más tóxica que betainas, alquil éter carboxilatos, e incluso aminas grasas (Li, 2000). Karpinska-Smulikowska y Moskal (Karpinska, 2004) ensayaron tensioactivos no iónicos fosfoorgánicos con *D. magna* y *Paramaecium caudatum*. Los valores de 48-h EC<sub>50</sub> fueron 30-760 mg/L para *P. caudatum* y 14-133 mg/L para *D. magna*, dependiendo del tipo de compuesto. Para alcoholes etoxilados, los ensayos de toxicidad aguda con *D. magna* (48 h) mostraron valores de toxicidad desde 0.4 a 0.7  $\mu\text{mol/L}$  (Morrall, 2003).

Los valores de toxicidad para el ensayo con *V. fischeri* (15-min EC<sub>50</sub>) fueron 14-29 mg/L (Tabla V.10). El más tóxico fue el alquilpoliglucósido APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, con la mayor longitud de cadena hidrocarbonada (más hidrofóbico), y el menos tóxico el APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> con la menor longitud de cadena alquílica. Se observó una tendencia similar para los valores de toxicidad con los ensayos con *D. magna* y *S. capricornutum* (Tabla V.11, V.12; Figura V.29), donde se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> con *D. magna* de 14 y 111 mg/L para APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> respectivamente; y valores de EC<sub>50</sub> con *S. capricornutum* de 81 y 1110 mg/L para APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> y APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Morrall y col. (Morrall, 2003) y García y col. (García, 1997), que encontraron que los alquilpoliglucósidos más hidrofóbicos – aquellos con la mayor longitud de cadena carbonada entre C<sub>9</sub> y C<sub>16</sub> – fueron los más tóxicos con *D. magna* y *V. fischeri*. Los valores de toxicidad (30-min EC<sub>50</sub>) se encuentran entre 7 y 16 mg/L en estos estudios. Otros estudios también han mostrado que los homólogos de alquilpoliglucósidos con cadenas alquílicas más largas presentan mayores valores de ecotoxicidad (Steber, 1995; Uppgard, 2000).

Los tensioactivos estudiados se encuentran dentro de la región de solubilidad en agua, considerando estudios previos realizados por Jurado y col. (Jurado, 2008) en un sistema binario conteniendo APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> y agua. La concentración micelar crítica aparece a la concentración de tensioactivo de 55% en peso. Un comportamiento similar fue publicado para APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> y APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> (65 % y 54 % en peso respectivamente), por Bravo y

col. (Bravo, 2007). Por tanto, se puede afirmar que la toxicidad está por debajo del límite de solubilidad para los tensioactivos estudiados.

Se observó una aparente reducción de la toxicidad si la  $EC_{50}$  se encuentra por debajo de la concentración micelar crítica. Sin embargo, los datos de CMC indican que la toxicidad observada para los alquilpoliglucósidos se encuentra por debajo de la correspondiente CMC. Hallazgos similares se han publicado para lineal alquilbenceno sulfonatos y ésteres sulfonatos (Hodges, 2006).

### 5.2.2.6 CONCLUSIONES

De los resultados, se puede concluir que *V. fischeri* es la más sensible de las tres especies estudiadas. Para los tres organismos ensayados, se encontró que el APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> es el menos tóxico. APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, fue ligeramente más tóxico que APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> para *D. magna*, mientras que ocurre lo contrario para *V. fischeri*. Estos dos últimos tensioactivos fueron 1.3 y 2.6 veces más tóxicos que APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> para *V. fischeri*. De los tres tipos de ensayos de toxicidad, el ensayo con *S. capricornutum* fue la especie menos sensible a los tres alquilpoliglucósidos.

### 5.2.2.7 CONCLUSIONS

From the results, we conclude that *V. fischeri* is the most sensitive of the three species tested. For all three test species, APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> was found to be the least toxic surfactant. APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> was slightly more toxic than APG-R<sub>8-14</sub>DP<sub>1.3</sub> for *D. magna*, while the reverse was true for *V. fischeri*. The latter two surfactants were 1.3 and 2.6 times more toxic than APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub> for *V. fischeri*. Of the three types of toxicity tests, the test with *S. capricornutum* was the least sensitive for all three alkylpolyglucosides.

### 5.2.2.8 REFERENCIAS

- Belanger, S., Guckert, J., Bowling, J., Begley, W., Davidson, D., Leblanc, E., Lee, D. (2000). Responses of aquatic communities to 25-6 alcohol ethoxylate in model stream ecosystems. *Aquatic Toxicology*, 48:135-150.
- Boeije, G., Cano, M., Marshall, S., Belanger, S., Van Compernelle, R., Dorn, P., Gümbel, H., Toy, R., Wind, T. (2006). Ecotoxicity quantitative structure-activity relationships for alcohol ethoxylate mixtures based on substance-specific toxicity predictions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:75-84.
- Bravo, V., Jurado, E., García-López, A., Vicaria, J.M., Ortega, M., Reyes, A., Cuevas, M., Fernández-Arteaga, A. (2007). Comportamiento reológico de disoluciones acuosas del alquilpoliglucósidos comerciales V. *Afinidad*, 532:709-717.
- Buschmann, N., Kruse, A., Wodarczak, S. (1995). Analytical methods for alkylpolyglucosides. I: Colorimetric Determination. *Tenside Surfactants Detergents*, 32(4): 336-339.
- Farré, M., García, M., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barceló, D. (2001). Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactans by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. *Analytica Chimica Acta*, 427:181-189.
- García, M., Ribosa, I., Campos, E., Sánchez-Leal, J. (1997). Ecological properties of alkylglucosides. *Chemosphere*, 35:545-556.

- Hodges, G., Roberts, D., Marshall, S., Dearden, J. (2006). The aquatic toxicity of anionic surfactants to *Daphnia magna*. A comparative QSAR study of linear alkylbenzene sulphonates and ester sulphonates. *Chemosphere*, 63:1443-1450.
- Jurado, E., Bravo, V., Vicaria, J.M., Fernandez-Arteaga, A., Garcia-López, A. (2008). Triolein solubilization using highly biodegradable non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A*, 326:162-168.
- Karpínska-Smulikowska, J., Moskal, J. (2004). Toxic effect of non-ionic phosphoorganic surfactants on selected organisms representing aquatic biocenosis. *Acta Toxicologica*, 12(1):61-66.
- Lewis, M.A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Research*, 25 (1):101-11.
- Li, H., Schröder, F. (2000). Surfactants-standard determination methods in comparison with substance specific mass spectrometric methods and toxicity testing by *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Water Science and Technology*, 42:391-398.
- Messinger, H., Aulmann, W., Kleber, M., Koehl, W. (2007). Investigations on the effects of alkyl polyglucosides on development and fertility. *Food and Chemical Toxicology*, 45:1375-1382.
- Morrall, D., Belanger, S., Dunphy, J. (2003). Acute and chronic aquatic toxicity structure-activity relationships for alcohol ethoxylates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56:381-3893.
- Sandbacka, M., Christianson, I., Isomaa, B. (2000). The Acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and Fish – A comparative Study. *Toxicology in Vitro*, 14: 61-68.
- Scheibel, J. (2004). The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7:319-328.
- Steber, J., Guhl, W., Steker, N., Schröder, F. (1995). Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surfactants Detergents*, 32:515-521.
- Uppgård, L., Sjöström, M., Wold, S. (2000). Multivariate quantitative structure-activity relationships for the aquatic toxicity of alkyl polyglucosides. *Tenside Surfactants Detergents*, 37:131-138.
- Willing, A., Messinger, H., Aulmann, W. (2004). Ecology and toxicology of alkyl polyglycosides. Handbook of Detergents Part B: Environmental Impact. Marcel Dekker, New York.
- Ying, G.G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3):417-431.

## **5.3-. Bloque III: Ozonización de Tensioactivos**



### 5.3.1 Artículo

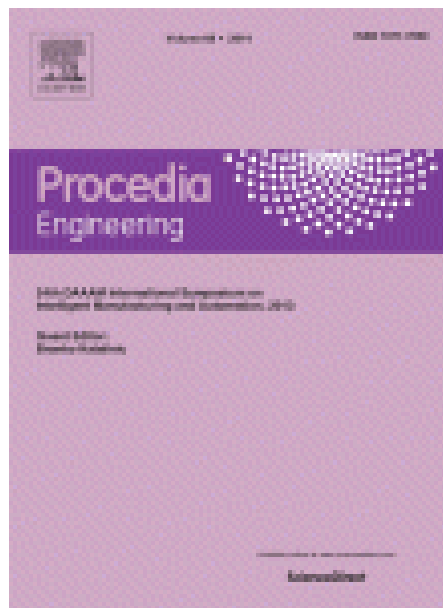
20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2012  
25-29 August 2012, Prague, Czech Republic

## **Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants**

M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Fernández-Arteaga, A. Burgos, F. Ríos

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

### Publicado en:



### **Procedia Engineering**

Editor: Elsevier BV

Editor-in-Chief: Dr. Petr Kluson

The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford ,  
OX5 1GB , United Kingdom

Volumen 42. Páginas 1038-1044.

Año: 2012

ISSN: 1877-7058

DOI: [10.1016/j.proeng.2012.07.495](https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.495)





### 5.3.1.1 RESUMEN

En este estudio se ha investigado la influencia de la ozonización en soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos. Los tensioactivos utilizados fueron óxidos de amina, los cuales constituyen una clase particular de tensioactivos no iónicos ya que presentan comportamiento catiónico en soluciones ácidas. Presentan buenas propiedades espumantes y son compatibles con la piel. El proceso de ozonización se llevó a cabo a 25 °C en un reactor agitado durante 30 min, donde se burbujeaba ozono gaseoso. El grado de mineralización alcanzado después del proceso de ozonización se evaluó mediante medidas del carbono orgánico total antes y después de la ozonización. Se estudió la influencia de la ozonización en la biodegradabilidad de las soluciones de tensioactivo mediante el ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida*. También se investigó la eficiencia de biodegradación de los óxidos de amina ozonizados. Los resultados muestran que la efectividad de la ozonización depende de la estructura química de la molécula de tensioactivo y que el proceso de ozonización solo mejora ligeramente la biodegradación de estos tensioactivos.

**Palabras clave:** ozonización, tensioactivos no iónicos, biodegradación, *pseudomonas putida*, óxidos de amina

### 5.3.1.2 ABSTRACT

The influence of ozonation of aqueous solutions of non-ionic surfactants was investigated in this study. The research was conducted using solutions of amine oxide based surfactants. These surfactants constitute a particular class of non-ionic surfactants that exhibit cationic behaviour in acid solution, they show good foaming properties and are skin compatible. The ozonation process was carried out at 25°C in a stirred tank reactor for 30 min, where gaseous ozone was bubbled. The degree of mineralization achieved after the ozonation process was evaluated by measuring the total organic carbon before and after ozonation. The influence of ozonation on biodegradability of the solutions was studied using the biodegradation test by *Pseudomonas putida*. Biodegradation efficiency of the ozonated amine oxides based surfactants was also evaluated. It was found that the effectiveness of ozonation depended on the chemical structure of surfactant molecule. Ozonation only slightly improved biodegradation of these surfactants.

**Keywords:** ozonation, non-ionic surfactants, biodegradation, *pseudomonas putida*, amine oxide based surfactants.



### 5.3.1.3 INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son uno de los principales componentes de las formulaciones detergentes tanto industriales como domésticas (Ledakowicz, 2005), y comprenden entre el 15 y el 40% del total de la formulación detergente (Scheibel, 2005). Sin embargo, su presencia en las aguas superficiales o residuales ocasiona muchos fenómenos indeseables.

Los tensioactivos tienen una influencia negativa en la fauna y flora que habita en las aguas superficiales, provocando eutrofización. Algunos detergentes inhiben el crecimiento de algas a la concentración de 1 mg/L, y la tasa tóxica para peces se encuentra entre 2 y 8 mg/L. Para los humanos, los detergentes son poco tóxicos, pero pueden inducir alergias en la piel. Esto implica la necesidad de tensioactivos de baja toxicidad y fácilmente biodegradables. La biodegradabilidad de los compuestos químicos es uno de los principales criterios en la evaluación del riesgo ecotoxicológico (Scott, 2000) y además es de gran importancia en el tratamiento biológico de todos los tipos de aguas residuales.

Los métodos para la eliminación de tensioactivos se pueden dividir en tres grupos: biológicos, mecánicos y químico/fisicoquímicos. La oxidación es el principal método para la descomposición química de los tensioactivos, implica complejos procesos líquido/gas donde la transferencia de materia y las reacciones químicas controlan la cinética global (Chelme-Ayala, 2010; Pedit, 1997). Por lo general, el proceso de ozonización es consecuencia de la contribución simultánea de diferentes vías de reacción: las reacciones directas del ozono molecular con los compuestos, las cuales son a menudo lentas y muy selectivas con el soluto (Beltrán, 2001), y las reacciones indirectas de los radicales hidroxilo, resultantes de la descomposición del ozono catalizado mediante iones hidroxilo a través de una serie de reacciones incluyendo iniciación y propagación (Staehelin, 1984; Buhler, 1984; Staehelin, 1985). Las reacciones indirectas de los radicales hidroxilo no son selectivas, son rápidas y su velocidad aumenta con el incremento del pH (Beltrán, 2001). El proceso de ozonización no permite una completa mineralización pero sí una oxidación parcial de los tensioactivos en ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas (Staehelin, 1984). La relación entre los procesos de ozonización de los tensioactivos y su biodegradabilidad y toxicidad acuática ha sido discutida durante mucho tiempo (Ledakowicz, 2005; Delanghe, 1991; Narkis, 1980; Narkis, 1987; Ungar, 1997; Gioldowska, 2004). Se conoce que los compuestos que contienen anillos aromáticos, como algunos tensioactivos, son menos susceptibles de la descomposición microbiana que compuestos análogos sin anillos benceno (Salanitro, 1995). Por tanto, la ozonización como agente de destrucción de compuestos aromáticos, tiene efectos beneficiosos en el aumento de la biodegradabilidad de los tensioactivos presentes en el medio acuático. En esta investigación, se estudia el efecto de la ozonización en la biodegradabilidad de tensioactivos no iónicos mediante el ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida*.

### 5.3.1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

#### Tensioactivos

En este estudio se utilizaron dos óxidos de amina: AO-R<sub>14</sub> y AO-R<sub>12</sub>, de nombre comercial OXIDET® DM-4 y OXIDET® DM-20 respectivamente y suministrados por Kao Corporation S.A (Tokyo, Japón) (apartado 3.1).

### Proceso de ozonización

El proceso de ozonización se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3.6.1.4. El grado de mineralización alcanzado después de la ozonización se evaluó mediante medidas de carbono orgánico total (TOC) según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.4.

### Ensayo de biodegradación con *Pseudomonas putida*

Las soluciones de tensioactivo ozonizadas se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de biodegradación con bacterias *Pseudomonas putida* de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.3.4. Se utilizó la cepa CECT 234 suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). La eficiencia de la biodegradación se determinó usando medidas del carbono orgánico disuelto (apartado 3.4.1.4).

## 5.3.1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Proceso de ozonización

Se analizó la ozonización de soluciones acuosas de tensioactivos no iónicos para dos óxidos de amina: AO-R<sub>14</sub> y AO-R<sub>12</sub>. La concentración inicial de los tensioactivos estudiados fue 50 y 100 mg/L para AO-R<sub>14</sub>, y 200 mg/L para AO-R<sub>12</sub>. Las concentraciones iniciales de los tensioactivos sometidos a ozonización fueron elegidas de modo que estuvieran por debajo de la concentración micelar crítica del tensioactivo. Las condiciones de los ensayos y los resultados de mineralización para los tensioactivos estudiados se muestran en las Tablas V.13 y V.14.

Tabla V.13.- Resultados de ozonización para AO-R<sub>14</sub>

Tiempo de ozonización (min)	Producción de Ozono (%)	Concentración de tensioactivo (mg/L)	Mineralización (%) (95% IC)	T <sup>a</sup> (°C)
30 min	50	50	5.67 (4.52-6.82)	25
30 min	100	100	37.64 (35.48-39.80)	25

Tabla V.14.- Resultados de ozonización para AO-R<sub>12</sub>

Tiempo de ozonización (min)	Producción de Ozono (%)	Concentración de tensioactivo (mg/L)	Mineralización (%) (95% IC)	T <sup>a</sup> (°C)
30 min	75	200	13.92 (12.09-15.75)	25
30 min	100	200	6.41 (5.75-7.07)	25

La ozonización de las disoluciones de tensioactivo provoca una disminución del TOC para los dos tensioactivos estudiados, pero el grado de mineralización alcanzado debido a la ozonización no es muy alto. A pesar de la moderada mineralización la estructura molecular sufre cambios inducidos por el ozono, provocando la formación de productos más biodegradables. Para el tensioactivo AO-R<sub>12</sub> el incremento en la producción de ozono no provoca un incremento en el grado de mineralización. La descomposición por ozono depende de la estructura química del tensioactivo. Comparando el % de reducción de la concentración de tensioactivo, se puede observar que la mineralización aumenta para el tensioactivo con mayor longitud de cadena alquílica. (Tablas V.13 y V.14).

De acuerdo con estos resultados y datos previamente publicados sobre oxidación de tensioactivos, puede afirmarse que la mineralización de tensioactivos causada por el ozono es lenta e incompleta. Sin embargo la formación de compuestos oxigenados,

principalmente ácidos carboxílicos de cadena corta, puede reducir el carácter hidrofóbico del tensioactivo original (Jurado, 2012).

### Influencia de la ozonización en la biodegradabilidad de tensioactivos

Los ensayos con bacterias *P. putida* tienen algunas ventajas particulares, como por ejemplo el poco tiempo que conlleva realizarlo, o que suponen un sistema de vida definitivo frente a la compleja y variable mezcla de microorganismos que existen en los lodos activados. Las soluciones utilizadas en los ensayos con *P. putida* fueron las disoluciones de tensioactivos ozonizadas tal y como se describió en el apartado anterior. La concentración inicial de tensioactivo en los ensayos fue 5 mg/L para AO-R<sub>14</sub> y 10 mg/L para AO-R<sub>12</sub>. En la Figura V.30 se muestra la eficiencia de biodegradación para los ensayos con *P. putida* para los dos tensioactivos, sin ozonizar y después de someterlo a la ozonización con objeto de poder comparar como influye la ozonización en la eficiencia de biodegradación del ensayo.

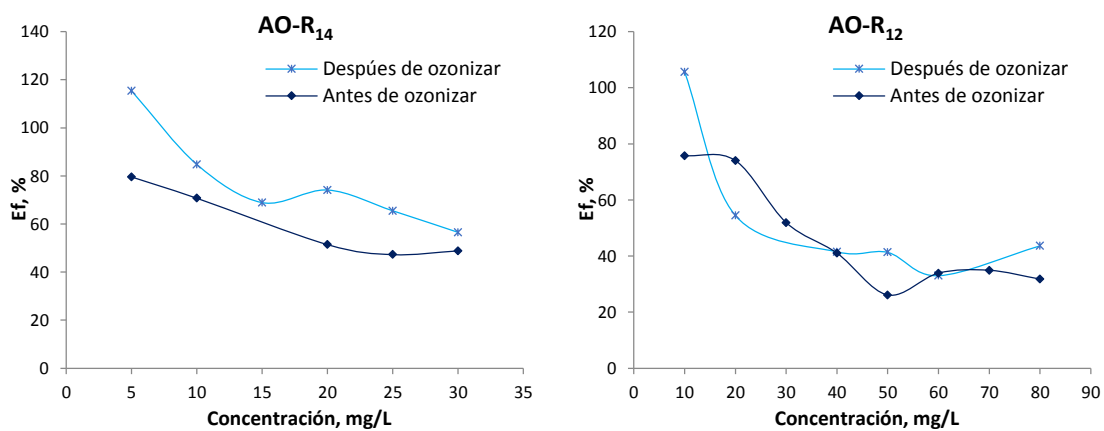


Figura V.30.- Comparación de la eficiencia de biodegradación en los ensayos con *P. putida* con y sin ozonización

Se obtuvo un incremento en la eficiencia de biodegradación con *P. putida* después de la ozonización, lo que indica que durante la ozonización se generan sustancias más biodegradables. En general, los ensayos con *P. putida* muestra un incremento en la eficiencia con el progreso de la reacción de ozonización, por tanto la ozonización mejora la biodegradación de los tensioactivos.

#### 5.3.1.6 CONCLUSIONES

La ozonización de las disoluciones de tensioactivo provoca una disminución del TOC para los tensioactivos AO-R<sub>14</sub> y AO-R<sub>12</sub>, pero el grado de mineralización obtenido por la ozonización no es muy alto. Para el tensioactivo AO-R<sub>12</sub> el incremento en el porcentaje de ozono en la mezcla de gas no provoca un aumento en el grado de mineralización. La efectividad de la ozonización depende de la estructura química de la molécula de tensioactivo. La ozonización solo mejora ligeramente la biodegradación de los óxidos de amina estudiados. Se obtuvo un incremento en la eficiencia del ensayo de biodegradación con *P. putida*, lo que indica que durante la oxidación se generan sustancias más biodegradables, por tanto se puede afirmar que la ozonización mejora la biodegradación de los tensioactivos estudiados.

#### 5.3.1.7 CONCLUSIONS

Ozonation of the surfactants solution causes a decrease of TOC for the surfactants AO-R<sub>14</sub> and AO-R<sub>12</sub>, but the mineralization degree due to ozonation is moderately high. For the

surfactant AO-R<sub>12</sub> the increase of the percentage of ozone in gas mixture does not increase the degree of mineralization. The effectiveness of ozonation depended on the chemical structure of surfactant molecule. Ozonation only slightly improved biodegradation of amide oxide based surfactants. An increase in biodegradation efficiency was obtained with *P. putida* test, indicating that more biodegradable substances had been generated during the oxidation. Ozonation improved biodegradation of the surfactants.

### 5.3.1.8 REFERENCIAS

- Beltrán-Heredia, J., Torregrosa, J., Domínguez, J.R., Peres, J.A. (2001). Kinetics of the reaction between ozone and phenolic acids present in argo-industrial wastewaters. *Water Research*, 35:1077-1085.
- Buhler, R.E., Staehelin, J., Hoigne, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 1. HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> and HO<sub>3</sub>/O<sub>3</sub> as intermediates. *The Journal of Physical Chemistry A*, 88:2560-2564.
- Chelme-Ayala, P., El-Din, M.G., Smith, D.W. (2010). Kinetics and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. *Chemosphere*, 78:557-562.
- Delanghe, B., Merkras, C.I., Graham, N.J. (1991). Aqueous ozonation of surfactants: a review. *Ozone: Science & Engineering*, 13:639-373.
- Gieldowska-Bulska, A., Perkowski, J., Kos, L. (2004). The application of ozone in the decomposition of aqueous solutions of nonionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 26:217-225.
- Jurado-Alameda, E., García-Román, M., Altmajer-Vaz, D., Jiménez-Pérez, J.L. (2012). Assessment of the use of ozone for cleaning fatty soils in the food industry. *Journal of Food Engineering*, 110:44-52.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J., Bulska, A., Jamroz, J., Sencio, B. (2005). Ozonation impact on degradation and toxicity of non-ionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 27:437-445.
- Narkis, N., Schneider-Rothel, M. (1980). Ozone-induced biodegradability of non-ionic surfactant. *Water Research*, 14:1225-1232.
- Narkis, N., Ben-David, M., Schneider-Rotel, M. (1987). Non-ionic surfactants interactions with ozone. *Tenside surfactants detergents*, 24:200-204.
- Pedit, J.A., Iwamasa, J.K., Miller, C.T., Glaze, W.H. (1997). Development and application of a gas-liquid contactor model for simulating advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology*, 31:2791-2796.
- Salanitro, J.P., Diaz, L.A. (1995). Anaerobic biodegradability testing of surfactants. *Chemosphere*, 30:813-830.
- Scheibel, J. (2005). The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7:319-328.
- Scott, M.J., Malcolm, N.J. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235-251.

Stahelin, J., Buhler, R.E., Hoigne, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 2. OH and HO<sub>4</sub> as chain intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 88:5999-6004.

Stahelin, J., Hoigne, J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science & Technology*, 19:1206-1213.

Ungar, W.C., Jonas, K., Schwammlein, O., Leitzke. (1997). Selective degradation of surfactants with ozone. Regional Conference on Ozone, UV Light, AOP in Water Treatment (pp.29-56), Amsterdam.





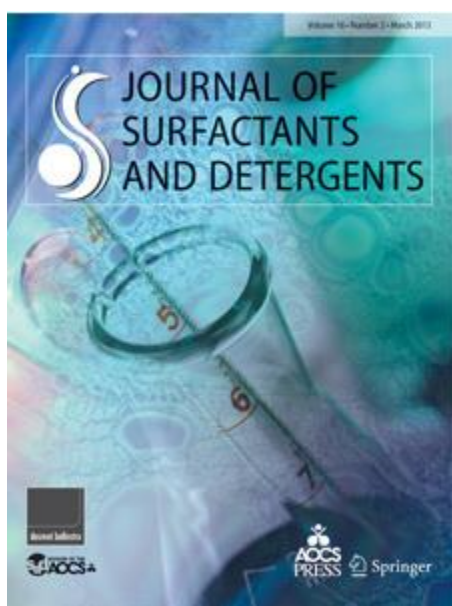
### 5.3.2 Artículo

## Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants

M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Burgos, F. Ríos

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

### Publicado en:



### Journal of Surfactants and Detergents

Editor: Springer Heidelberg

Editor-in-Chief: Jean L. Salager

Tiergartenstrasse 17, D-69121 Heidelberg, Alemania.

Volumen 17, número 2. Páginas 363-370.

Año: 2014

ISSN: 1097-3958

DOI: [10.1007/s11743-013-1480-2](https://doi.org/10.1007/s11743-013-1480-2)



### 5.3.2.1 RESUMEN

En este trabajo se investiga la biodegradación primaria y final de tensioactivos aniónicos y no iónicos para evaluar el uso combinado de la ozonización y biodegradación en la eliminación de tensioactivos. Los tensioactivos utilizados fueron alquilpoliglucósidos y lineal alquilbenceno sulfonato. El tensioactivo aniónico, el cual contiene un anillo de benceno en su estructura, se oxidó más rápido que el tensioactivo no iónico. Ambos tensioactivos mostraron una mineralización pobre debida a la ozonización, indicando que el ozono ataca principalmente los enlaces de carbono. Los resultados indican que la eliminación de tensioactivos y del carbono orgánico total se incrementa por el uso consecutivo de ozonización y biodegradación.

*Palabras clave:* tensioactivos aniónicos, biodegradación, proceso combinado, tensioactivos no iónicos, ozonización.

### 5.3.2.2 ABSTRACT

This study investigated the extent of primary and final biodegradation of anionic and non-ionic surfactants to evaluate the combined use of ozonation and biodegradation in surfactant removal. The surfactants used were alkylpolyglucosides and linear alkyl benzene sulfonates. The anionic surfactant containing a benzene ring on its structure was oxidized faster than was the non-ionic surfactant. Both surfactants showed poor mineralization due to ozonation indicating an ozone attack primarily on carbon bonds. The results indicate that the removal of surfactants and of the total organic carbon is increased by the consecutive use of ozonation and biodegradation.

*Keywords:* anionic surfactants, biodegradation, combined processes, non-ionic surfactants, ozonation.



### 5.3.2.3 INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son uno de los componentes principales de las formulaciones detergentes (Ledakowicz, 2005), tanto en usos industriales como en aplicaciones domésticas, y suponen entre el 15 y el 40% del total de la formulaciones detergentes (Scheibel, 2005). Sin embargo, la presencia de tensioactivos en aguas superficiales y aguas residuales conlleva muchos fenómenos indeseables como es el daño a la fauna y flora que habita en las aguas superficiales debido a que causan eutrofización. Algunos detergentes inhiben el crecimiento de algas a concentraciones de 1 mg/L, y la dosis tóxica para peces se encuentra entre 2 y 8 mg/L. Para los humanos, los detergentes son poco tóxicos pero pueden inducir alergias en la piel. Los hechos anteriormente mencionados hacen necesario el uso de tensioactivos de baja toxicidad y que sean fácilmente biodegradables. Uno de los criterios principales en la evaluación del riesgo ecotoxicológico de un compuesto químico es su biodegradabilidad (Scott, 2000), y esto es también de gran importancia en el tratamiento biológico de todo tipo de aguas residuales.

Los métodos para eliminar tensioactivos se pueden dividir en tres grupos: biológicos, mecánicos, y químicos/fisicoquímicos. La oxidación es uno de los principales métodos de descomposición de los tensioactivos, que implica complejos procesos gas-líquido donde la transferencia de materia y las reacciones químicas controlan la cinética global (Chelme-Ayala, 2010; Pedit, 1997). Normalmente, diferentes rutas de degradación contribuyen simultáneamente al proceso de ozonización. El ozono molecular principalmente ataca a los anillos aromáticos, alquenos y alquinos con una alta selectividad y baja velocidad de reacción (Ledakowicz, 2005; Beltrán-Heredia, 2001). De forma paralela, hay un gran número de reacciones secundarias por parte de los radicales hidroxilo, radicales resultantes en la descomposición del ozono catalizada por los iones hidroxilo a través de una serie de reacciones, incluyendo iniciación y propagación (Staehelin, 1984; Buhler, 1984; Staehelin, 1985; Glace, 1986). Las reacciones indirectas de los radicales hidroxilo no son selectivas, son rápidas y aumentan su velocidad cuando aumenta el pH (Beltrán-Heredia, 2001). Los procesos de ozonización no permiten completar la mineralización pero si la oxidación parcial de los tensioactivos a ácidos orgánicos, aldehídos y cetonas (Satahelin, 1984). Sin embargo el papel del ozono molecular como destructor de anillos puede ser considerado como una importante herramienta para mejorar la biodegradabilidad de las disoluciones de tensioactivo.

Se conoce que los compuestos que contienen anillos aromáticos (Salanitro, 1995), como algunos tensioactivos, son menos susceptibles a la descomposición microbiana que compuestos análogos sin anillos de benceno. Por esto, el uso de la ozonización como vía de destrucción de los anillos aromáticos puede tener efectos beneficiosos como el incremento de la biodegradabilidad de los tensioactivos presentes en el medio acuático. Muchos trabajos han examinado la relación entre el proceso de ozonización de las disoluciones de tensioactivo, su biodegradabilidad y su toxicidad acuática (Ledakowicz, 2005; Delanghe, 1991; Narkis, 1980; Narkis, 1987; Ungar, 1997; Gieldowska-Bulska, 2004). Sin embargo, existe una falta de investigación sobre los efectos de la ozonización en la biodegradación. El presente estudio investiga el grado de biodegradación de los tensioactivos para evaluar el uso combinado de ozonización y biodegradación en la eliminación de tensioactivos.

### 5.3.2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

#### Tensioactivos

En este estudio se usaron dos tensioactivos: el lineal alquilbenceno sulfonato LAS-R<sub>11-14</sub> suministrado por Petresa (Madrid, España), y el tensioactivo no iónico alquilpoliglucósido APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, manufacturado por Henkel KgaA (Düsseldorf, Alemania) y suministrado por Sigma (apartado 3.1).

#### Proceso de ozonización

Para el estudio de la ozonización de los tensioactivos el proceso se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3.6.1.4. La concentración inicial de tensioactivo en el reactor fue de 80 mg/L y se ozonizó durante 30 minutos a temperatura constante de 25 °C. Para llevar a cabo el estudio de biodegradación después de la ozonización, el proceso se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.6.1.3, donde las disoluciones fueron ozonizadas durante 15 minutos en matraces erlenmeyer de 2 litros, a temperatura constante de 25 °C, y con concentraciones iniciales de tensioactivo de 15 y 35 mg/L.

La biodegradación primaria se monitorizó mediante medidas de la concentración residual de tensioactivo en el tiempo usando el método de las sustancias activas al azul de metileno (MBAS) (apartado 3.4.1.1) para LAS-R<sub>11-14</sub>, y el método de la antrona (apartado 3.4.1.3) para APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>. El grado de mineralización alcanzado se evaluó mediante medidas del carbono orgánico total de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.4.

#### Ensayo de biodegradación

El ensayo estático de biodegradación se llevó a cabo de acuerdo al ensayo para biodegradabilidad fácil OCDE 301 E (apartado 3.3.1). La biodegradación se estudió a diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo, 15 y 35 mg/L (por encima y por debajo de su CMC). Los ensayos se realizaron con disoluciones de tensioactivo sin ozonizar y con los tensioactivos previamente ozonizados.

#### Medidas de tensión superficial

La tensión superficial de la disolución durante el proceso de ozonización se midió entre 0 y 30 min siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2. Para las medidas se utilizó el tensiómetro modelo Tensiometer K11 de Krüss GmbH (Hamburgo, Alemania).

### 5.3.2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Ozonización de tensioactivos

La ozonización de disoluciones acuosas de tensioactivos aniónicos y no iónicos se analizó utilizando dos tensioactivos comerciales: LAS-R<sub>11-14</sub> y APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>. La concentración inicial fue de 80 mg/L antes de la ozonización y el pH de la disolución neutro, aunque durante el proceso de ozonización, la acidez de la disolución aumentó.

Se encontró que la concentración de tensioactivo residual disminuye rápidamente durante el tiempo de ozonización. El tiempo necesario para eliminar el 50% de la concentración inicial de tensioactivo depende del tensioactivo estudiado. Para APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, este tiempo fue 25.8 minutos y para el caso del LAS-R<sub>11-14</sub> fue de 7.13 minutos. Para el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub> la concentración disminuye exponencialmente con el tiempo de ozonización mientras que para APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> la concentración de tensioactivo disminuye linealmente, excepto para el tiempo inicial. Se puede decir que el tensioactivo

aniónico, que tiene un anillo de benceno en su estructura, se oxidó más rápido que el tensioactivo no-iónico. Para ambos tensioactivos, la descomposición inducida por el ozono resultó incompleta después de 30 minutos.

La velocidad de destrucción del tensioactivo en disolución acuosa por el ozono se puede describir por la siguiente ecuación propuesta, similar a la usada por Hoigné y col. (Hoigné, 1998):

$$-\frac{d[T]}{dt} = K_1 \cdot [O_3]^m \cdot [T]^n + K_2 \cdot [OH\cdot]^k \cdot [T]^n + \sum_{i=3}^N K_i \cdot [X_i]^l \cdot [T]^n$$

Ecuación V.16

donde:

[T]: concentración de tensioactivo

[O<sub>3</sub>]: concentración de ozono

[OH·]: concentración de radicales libres

K<sub>i</sub>: Constante de la velocidad de reacción

X<sub>i</sub>: otros radicales involucrados en la degradación de tensioactivo

Considerando la dificultad para determinar la mayoría de los parámetros involucrados en las reacciones de ozonización intermedias, así como el tipo y la cantidad de reactivos reaccionando sobre el tensioactivo inicial, se puede asumir una ecuación simplificada. Esta ecuación representa la degradación global del tensioactivo inicial:

$$-\frac{d[T]}{dt} = K_G \cdot [T]^n$$

Ecuación V.17

donde:

K<sub>G</sub>: constante de reacción global

si n = 1

$$\ln\left(\frac{[T]}{[T_0]}\right) = K_G \cdot t$$

Ecuación V.18

si n ≠ 1

$$\frac{[T]^{1-n}}{n-1} = K_G \cdot t + \frac{[T_0]^{1-n}}{n-1}$$

Ecuación V.19

Los datos fueron ajustados a las Ecuaciones V.18 y V.19. Los parámetros calculados se resumen en la Tabla V.15.

Tabla V.15.- Parámetros del modelo de ajuste y constantes cinéticas

Tensioactivo	n	K <sub>G</sub>	K <sub>G</sub> error	R <sup>2</sup>
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	1	0.0287	9.31 E <sup>-4</sup>	0.987
LAS-R <sub>11-14</sub>	2	0.0017	6.57 E <sup>-5</sup>	0.994



En la Figura V.31 se muestra el efecto de la ozonización en la descomposición de las soluciones acuosas de APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub> en función del tiempo de ozonización. Las curvas teóricas basadas en las Ecuaciones V.18 y V.19 concuerdan con los datos experimentales.

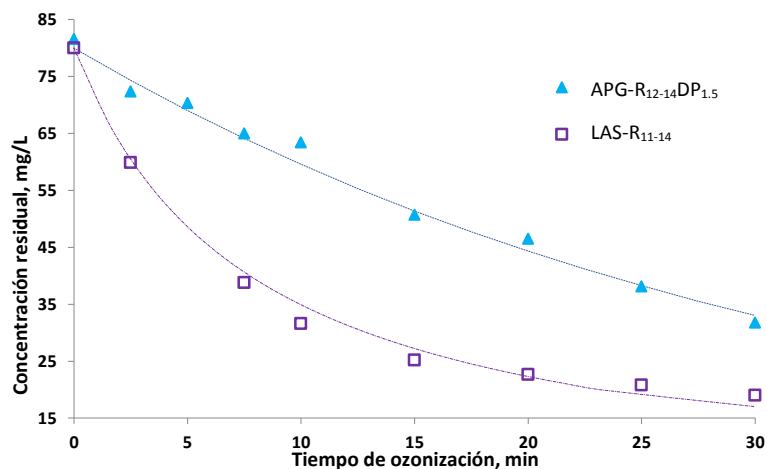


Figura V.31.- Efecto de la ozonización en la descomposición de las soluciones acuosas de APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub> en función del tiempo de ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C. Modelo basado en las Ecuaciones V.18 y V.19

Junto con la biodegradación primaria, la biodegradación última de los tensioactivos se estableció bajo condiciones aeróbicas durante el ensayo de ozonización. La Figura V.32 muestra la evolución de la biodegradación última del APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub> en el periodo de ozonización. La concentración inicial en el ensayo fue 80 mg/L. La mineralización final alcanzada al final del ensayo, min (%), se calculó usando la siguiente expresión:

$$Min (\%) = \frac{[TOC]_i - [TOC]_f}{[TOC]_i} \cdot 100$$

Ecuación V. 20

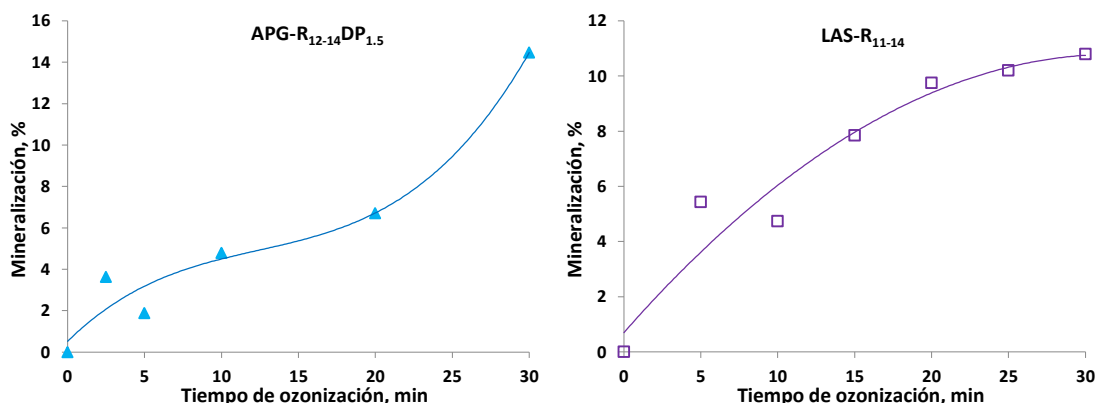


Figura V.32.- Porcentaje de mineralización de las soluciones acuosas de APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub> en función del tiempo de ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C

La mineralización obtenida fue del 17.1 % para el APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y 12.94 % para el LAS-R<sub>11-14</sub>, en el periodo de 30 minutos de ozonización.

La disminución en el contenido del TOC fue más ligera que la caída en el porcentaje de tensioactivo inicial. Estos resultados muestran la pobre mineralización debido a la

ozonización, lo que indica que el ozono ataca en primer lugar a los enlaces de carbono en el anillo aromático. El tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> tiene orden de reacción uno, mientras que el LAS-R<sub>11-14</sub> tiene orden de reacción dos (Figura V.31). LAS-R<sub>11-14</sub> presenta menores valores de concentración residual (Figura V.31) y de mineralización final (Figura V.32) a los 30 minutos de ozonización comparado con el APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>. El ozono molecular, sin tener en cuenta los tensioactivos secundarios producidos por la descomposición del ozono, ataca en primer lugar a los grupos con dobles enlaces, como los presentes en los anillos aromáticos del LAS-R<sub>11-14</sub>, esto explica la mayor descomposición de este tensioactivo respecto al APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y la diferencia en cuanto al orden de reacción de estos dos tensioactivos. Estos resultados destacan la gran selectividad del ozono por los anillos aromáticos como señalaron Ledakowicz y col. (Ledakowicz, 2005), lo que puede ser la razón por la que se alcanzan mayores niveles de descomposición en el caso de tensioactivos con anillos en lugar de tensioactivos sin ellos, debido a una cierta inhibición con respecto a las reacciones radicalarias caracterizadas por ser más rápidas y menos selectivas (Glance, 1986).

La Figura V.33 representa el cambio en la tensión superficial en función del tiempo de ozonización. Se encontró una clara tendencia de aumento de la tensión superficial durante el progreso de la ozonización. Esto parece indicar que los productos de descomposición de los tensioactivos tienen, por lo menos todos en conjunto, menor actividad superficial que tenía el tensioactivo de partida. A 5 minutos, la ozonización fortalece la tensión superficial, probablemente debido a la movilización del tensioactivo hacia la capa de espuma formada al inicio del ensayo de ozonización y también debido a la ruptura inicial del tensioactivo, lo que supone la formación de productos que tienen menor actividad superficial. Sin embargo, la capa de espuma no persiste suficiente tiempo para explicar la altos valores de tensión superficial alrededor de los 10 minutos de reacción, por esto se puede concluir que los elevados valores de tensión superficial están relacionados con productos intermedios de menor actividad superficial.

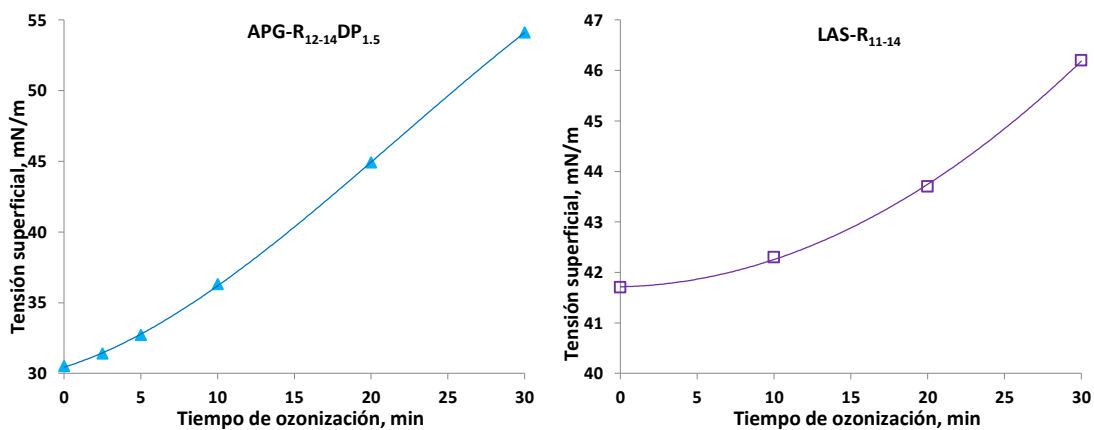


Figura V.33.- Evolución de la tensión superficial durante la ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C

En la Figura V. 34 se muestra la eliminación del tensioactivo mediante biodegradación y mediante biodegradación combinada con una ozonización inicial en función del tiempo. La concentración se expresa como el porcentaje de tensioactivo residual y cada punto de la gráfica representa el valor medio de dos réplicas. Las concentraciones iniciales en los ensayos de biodegradación fueron 15 y 35 mg/L. Estas concentraciones se eligieron de modo que estuvieran por encima y debajo de la CMC de los tensioactivos.

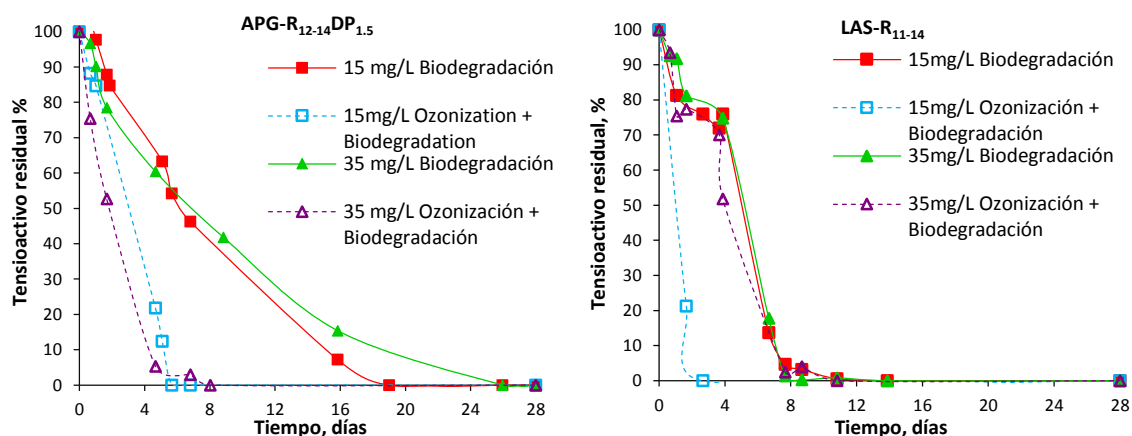


Figura V.34.- Eliminación de tensioactivos mediante biodegradación, y ozonización más biodegradación en función del tiempo para los tensioactivos APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub>

En un análisis preliminar de los perfiles de biodegradación primaria, se encontró que para los dos tensioactivos, la concentración residual de tensioactivo rápidamente disminuye en el avance del ensayo. La concentración de tensioactivo disminuye exponencialmente y el periodo de adaptación fue despreciable para todos los tensioactivos.

Para comparar y cuantificar los ensayos, se evaluaron algunos parámetros característicos de los perfiles de biodegradación (Jurado, 2007): tiempo de latencia ( $t_L$ ), tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ), velocidad media de biodegradación hasta alcanzar el 85 % de biodegradación ( $V_M$ ), y la biodegradabilidad a 50 horas de ensayo (B). En la Tabla V.16 se muestran estos parámetros.  $S_0$  es la concentración inicial de tensioactivo en los ensayos en mg/L mientras que  $t_T$  es el tiempo total de duración del ensayo en horas.

Tabla V.16.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación durante la biodegradación con y sin ozonizar

	$S_0$ , mg/L	$t_T$ , h	$t_L$ , h	$t_{1/2}$ , h	$V_M$ , %/h	B, %	Mineralización final %
<b>APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub></b>							
Biodegradación	15	672	23	142	0.35	15	85.97
	35	672	16	108	0.46	34	65.47
Ozonización + biodegradación	15	672	-	72	0.69	29	82.27
	35	672	-	43	1.16	55	87.27
<b>LAS-R<sub>11-14</sub></b>							
Biodegradación	15	672	86	125	0.40	22	43.34
	35	672	53	130	0.38	15	43.17
Ozonización + biodegradación	15	672	-	24	2.08	90	77.43
	35	672	58	99	0.50	23	45.73

$S_0$ : concentración inicial de tensioactivo;  $t_T$ : tiempo total de ensayo;  $t_L$ : tiempo de latencia;  $t_{1/2}$ : tiempo de vida medio;  $V_M$ : velocidad media de biodegradación hasta alcanzar el 85% de biodegradación; B: biodegradabilidad a las 50 horas de ensayo

En general, el aumento en la concentración inicial de tensioactivo no afectó significativamente al tiempo de latencia. Los parámetros  $t_{1/2}$  y  $V_M$  están relacionados con la tasa de eliminación del tensioactivo;  $t_{1/2}$  disminuye ligeramente, la velocidad media de biodegradación aumenta con la combinación de biodegradación más ozonización para las concentraciones de tensioactivo por encima y por debajo de la CMC. Eso indica que la biodegradación es mayor con el uso combinado de ozonización y biodegradación.

Para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, la biodegradabilidad a 50 horas de ensayo es mayor para mayor concentración inicial de tensioactivo. Para los dos tensioactivos usados, B es mayor en el caso del uso combinado de ozonización seguido de biodegradación.

Para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> la biodegradabilidad primaria es mayor para concentraciones por encima de la CMC. Para el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub> se observó el efecto contrario.

En la Tabla V.16 se muestran los valores de mineralización durante los ensayos de biodegradación y ozonización, y en la Figura V.35 se presentan el porcentaje de mineralización final para el ensayo de biodegradación así como para el ensayo de ozonización más biodegradación. Las curvas de mineralización presentadas tienen tres fases bien diferenciadas: la fase de aclimatación de los microorganismos, una rápida disminución en la concentración debido a la metabolización por parte de los microorganismos y un periodo en el cual la concentración residual permanece prácticamente constante. Para ambos tensioactivos, un incremento en la concentración inicial de tensioactivo conlleva una disminución de la mineralización.

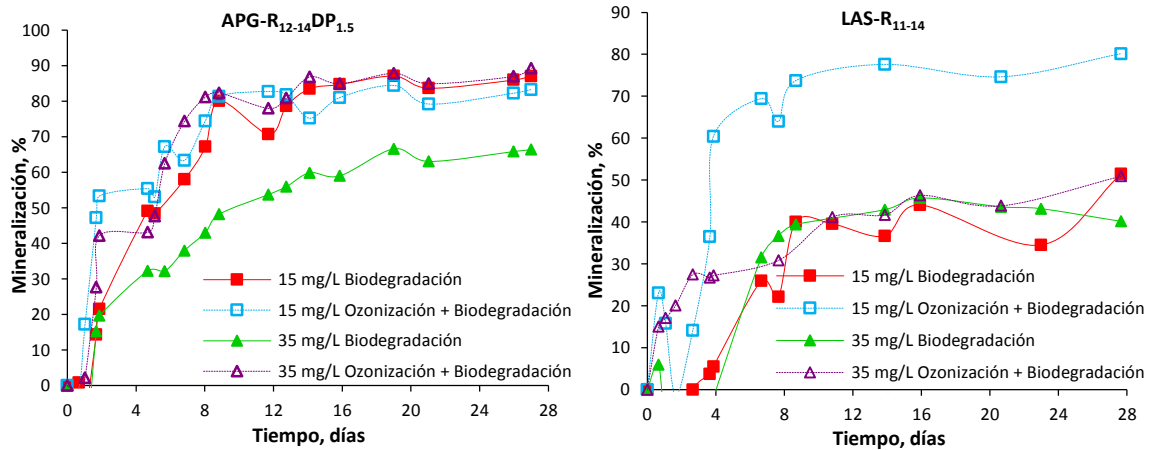


Figura V.35.- Mineralización de tensioactivos mediante biodegradación, y ozonización más biodegradación en función del tiempo para los tensioactivos APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y LAS-R<sub>11-14</sub>

Para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, el porcentaje de biodegradación final alcanzado supera el 60%. La legislación existente, reglamento CE n° 1336 (2008) (CE/1336/2008), requiere un mínimo del 60 % de biodegradación final tras 28 días, cuando se aplica uno de los métodos recogidos en el Apéndice III de la legislación europea n° 648/2004. Si se cumple, el tensioactivo puede considerarse biodegradable. Para los dos tensioactivos, la biodegradación final de las muestras de ozono aumenta inicialmente. El incremento fue más pronunciado para el ensayo por debajo de la CMC que para el ensayo por encima de la CMC, con respecto a las muestras no ozonizadas. Sin embargo, para APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, a tiempos por encima de más de 10 días, se observa la tendencia contraria en la cual las muestras ozonizadas por encima de la CMC presentan mayor incremento en la biodegradación final respecto a las muestras no ozonizadas.

Para el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub>, la tendencia del incremento de la mineralización final fue mayor para las muestras ozonizadas por debajo de la CMC que para las muestras por encima de la CMC, con respecto a las muestras no ozonizadas.

Para ambos tensioactivos, el uso combinado de la biodegradación y ozonización permite una disminución más rápida en la concentración residual de tensioactivo que en el caso de solo la biodegradación. Mediante el uso de la biodegradación y la ozonización, la concentración de tensioactivo es despreciable después de aproximadamente 8 días. En este

momento el incremento en la mineralización parece ser debido a la aparición de especies con bajo peso molecular resultantes del ataque del ozono. En torno a este tiempo hay también un cambio en la tendencia de los datos de mineralización, la cual se vuelve más lenta como se muestra en el Figura V.35. Sin embargo cuando no se aplica en los ensayos el ozono, no se observa el cambio mencionado en la tendencia de la curva de mineralización.

### 5.3.2.6 CONCLUSIONES

Si la disminución de concentración residual de tensioactivo y la mineralización con el tiempo (Figuras V.34 y V.35 respectivamente) son consideradas conjuntamente, los resultados indican que la eliminación de tensioactivo y el carbono orgánico total se incrementa por el uso consecutivo de ozonización y biodegradación. La ozonización, mediante la destrucción de los anillos aromáticos, genera moléculas de menor peso molecular, favoreciendo el metabolismo de las especies orgánicas por parte de los microorganismos y su eliminación del medio (Rivera-Utrilla, 2012). Por lo tanto, la ozonización facilita el posterior tratamiento de las aguas residuales en las plantas convencionales de tratamiento biológico.

### 5.3.2.7 CONCLUSIONS

If the residual surfactant concentration and mineralization decrease over time (Figures V.34, V.35, respectively) are considered jointly, the results seem to indicate that the removal of surfactants and the total organic carbon is increased by the consecutive use of ozonation and biodegradation. Ozonation, by destroying aromatic rings, generates molecules with lower molecular weight, favoring metabolism of the organic species present by the microorganisms and their removal from the medium (Rivera-Utrilla, 2012). Therefore, ozonation can facilitate the subsequent treatment of the washing wastewaters in a conventional biological plant.

### 5.3.2.8 REFERENCIAS

- Beltrán-Heredia, J., Torregrosa, J., Domínguez, J.R., Peres, J.A. (2001). Kinetics of the reaction between ozone and phenolic acids present in agro-industrial wastewaters. *Water Research*, 35:1077-1085.
- Buhler, R.E., Staehelin, J., Hoigne, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 1. HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> and HO<sub>3</sub>/O<sub>3</sub> as intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 88:2560-2564.
- Chelme-Ayala, P., El-Din, M.G., Smith, D.W. (2010). Kinetics and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. *Chemosphere* 78:557-562.
- Delanghe, B., Merkras, C.I., Graham, N.J. (1991). Aqueous ozonation of surfactants: a review. *Ozone: Science & Engineering*, 13:639-673.
- Gieldowska-Bulska, A., Perkowski, J., Kos, L. (2004). The application of ozone in the decomposition of aqueous solutions of nonionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 26:217-225.
- Glance, W. (1986). Reactions products of ozone: a review. *Environmental Health Perspectives*, 69:151-157.

- Hoigné, J. (1998). Chemistry of aqueous ozone, and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. In J. Hubrec (Ed.) *The handbook of environmental chemistry*, Vol. 5, Part C. Quality and treatment of drinking water (83-141). Springer, Berlin.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Luzón, G., Lechuga, M. (2007). Primary biodegradation of commercial fatty-alcohol ethoxylate surfactants: characteristic parameters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10:145-153.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J., Bulska, A., Jamroz, J., Sencio, B. (2005). Ozonation impact on degradation and toxicity of non-ionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 27:437-445.
- Narkis, N., Schneider-Rothel, M. (1980). Ozone-induced biodegradability of non-ionic surfactant. *Water Research*, 14:1225-1232.
- Narkis, N., Ben-David, M., Schneider-Rotel, M. (1987). Non-ionic surfactants interactions with ozone. *Tenside Surfactants Detergents*, 24:200-204.
- Pedit, J.A., Iwamasa, J.K., Miller, C.T., Glaze, W.H. (1997). Development and application of a gas-liquid contactor model for simulating advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology*, 31:2791-2796.
- Reglamento CE nº8 1336 (2008). Reglamento (CE) nº8 1336/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, que modifica el Reglamento (CE) nº8 648/2004 para adaptarlo al Reglamento (CE) nº8 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. (DO L 354, 31.12.2008).
- Rivera-Utrilla, J., Bautista-Toledo, M.I., Sánchez-Polo, M., Méndez-Díaz, J.D. (2012). Removal of surfactant dodecylbenzene-sulfonate by consecutive use of ozonation and biodegradation. *Engineering in Life Sciences*, 12:113-116.
- Salanitro, J.P., Diaz, L.A. (1995). Anaerobic biodegradability testing of surfactants. *Chemosphere*, 30:813-830.
- Scheibel, J. (2005). The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. *Journal of Surfactants and Detergents*, 7:319-328.
- Scott, M.J., Malcolm, N.J. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235-251.
- Stahelin, J., Buhler, R.E., Hoigne, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 2. OH and HO<sub>4</sub> as chain intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 88:5999-6004.
- Stahelin, J., Hoigne, J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science & Technology*, 19:1206-1213.
- Ungar, W.C., Jonas, K., Schwammlein, O., Leitzke. (1997). Selective degradation of surfactants with ozone. Regional Conference on Ozone, UV Light, AOP in Water Treatment (pp.29-56), Amsterdam.



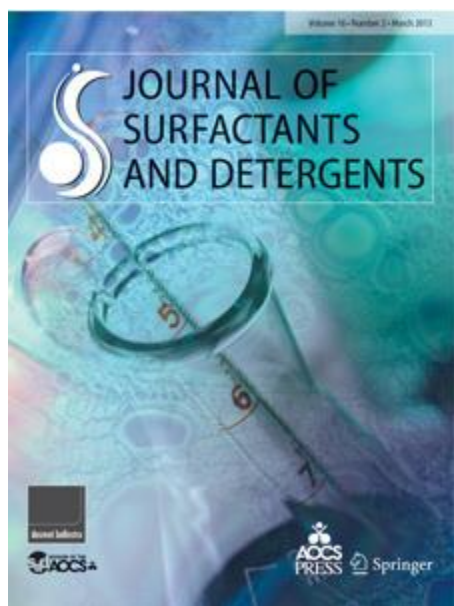
### 5.3.3 Artículo

## Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: Impact on aquatic toxicity

M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Burgos, F. Ríos

*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda. Fuentenueva s/n. 18071, Granada, España.*

### Publicado en:



### Journal of Surfactants and Detergents

Editor: Springer Heidelberg

Editor-in-Chief: Jean L. Salager

Tiergartenstrasse 17, D-69121 Heidelberg, Alemania.

Volumen 16, número 5. Páginas 779-784.

Año: 2013

ISSN: 1097-3958

DOI: [10.1007/s11743-013-1464-2](https://doi.org/10.1007/s11743-013-1464-2)





### 5.3.3.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio es investigar la influencia de la ozonización en la toxicidad acuática de tensioactivos comerciales aniónicos y no iónicos. Los valores de toxicidad se determinaron utilizando bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*. Se realizaron medidas de tensión superficial para estudiar la actividad interfacial. El comportamiento de los tensioactivos frente a la ozonización depende de la estructura química. Se encontró que algunos productos intermedios de la ozonización son más tóxicos que el tensioactivo base, mientras que otros resultaron ser menos tóxicos. Los tensioactivos con anillos aromáticos como el lineal alquilbenceno sulfonato, o tensioactivos con grupos glucosídicos como los alquilpoliglucósidos, presentan menor toxicidad después de la ozonización. Por otra parte, los grupos éter presentes en los alcoholes grasos etoxilados y en los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y los grupos derivados de ácidos carboxílicos presentes también en los éteres carboxílicos, conducen a un aumento de la toxicidad después de la ozonización. Los tensioactivos con grupos éter probablemente forman compuestos polietoxilados de cadena corta y ácidos carboxílicos, los cuales son los posibles responsables de la disminución de la tensión superficial que promueve el incremento de la toxicidad.

*Palabras clave:* Tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, ozonización, toxicidad

### 5.3.3.2 ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the influence of ozonation of anionic and non-ionic surfactants on their aquatic toxicity. Toxicity values of various commercially important anionic and non-ionic surfactants have been determined using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Surface tension measurements were made to study the interfacial activity. The behavior depends on the chemical structure. Some intermediate ozonation products were found to be more toxic than the base surfactant and others were found to be less. Surfactants with aromatic rings such as linear alkyl benzene sulfonates, or surfactants with glycosidic groups such as alkylpolyglucosides, exhibit a lower toxicity after ozonation. On the other hand, ether groups present in the fatty-alcohol ethoxylates and ether carboxylic derivative surfactants, and carboxylic acid derivatives present in the ether carboxylic derivative surfactants lead to increasing toxicity after ozonation. Surfactants with ether groups probably formed short-chain polyethoxylated compounds and carboxylic acids, which are possibly responsible for the surface-tension decrease that promotes the toxicity increase.

*Keywords:* Anionic surfactants, non-ionic surfactants, ozonation, toxicity



### 5.3.3.3 INTRODUCCIÓN

Los tensioactivos son ampliamente utilizados en procesos industriales y productos de consumo. Se utilizan como estabilizadores de emulsiones, espumantes, detergentes, humectantes, en separación de minerales, formulaciones farmacéuticas y otros muchos usos. En función de su concentración y sus inherentes propiedades químicas, pueden tener una acción destructiva en la fauna y flora de las aguas superficiales. Actualmente, la mejor manera para tratar los tensioactivos de las aguas residuales urbanas e industriales es mediante degradación biológica de lodos activados en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Numerosos estudios han determinado que mediante procesos aeróbicos se pueden alcanzar elevados niveles de biodegradación (97-99%) en plantas de tratamiento de aguas residuales (Di Croacia, 1999; Scott, 2000). Sin embargo, la biodegradación puede verse inhibida a concentraciones de tensioactivo superiores a 50 mg/L debido a su toxicidad.

Varios estudios sobre la ozonización como método químico de eliminación de tensioactivos (Delanghe, 1991; Ledakowicz, 1997; Narkis, 1980; Ungar, 1997; Zhao, 2011) han suministrado resultados muy alentadores. La ozonización implica complejos procesos líquido-gas donde la transferencia de materia y las reacciones químicas controlan la cinética global (Chelme-Ayala, 2010; Pedit, 1997). El ozono y los radicales hidroxilo (OH), generados por el ozono disuelto en la disolución acuosa a través de una serie de reacciones incluyendo iniciación y propagación (Stahelin, 1984; Buhler, 1984; Stahelin, 1985), raramente permiten una completa mineralización, pero sí una oxidación parcial de los tensioactivos a ácidos orgánicos, cetonas y aldehídos (Stahelin, 1985). El ozono reacciona rápidamente con los compuestos insaturados, pero lentamente con los saturados, y lo hace mediante dos mecanismos: reacciones directas del ozono molecular con los compuestos y reacciones indirectas de los radicales hidroxilos resultantes de la descomposición del ozono catalizado mediante el ion hidroxilo. Las reacciones directas son a menudo altamente selectivas y lentas, mientras que las reacciones indirectas con el radical hidroxilo no son selectivas, son rápidas y aumentan su velocidad cuando aumenta el pH (Beltrán-Heredia, 2001).

Existe bibliografía específica relativa a la aplicación del ozono en el tratamiento de aguas residuales industriales que se remonta a los años setenta, cuando se publicó un compendio de casos sobre el ozono. Industrias relacionadas tanto con compuestos orgánicos como inorgánicos han usado el ozono para la descontaminación y desinfección (Beltrán, 2004). La ozonización es muy efectiva en el tratamiento de aguas y en aguas residuales que contienen compuestos recalcitrantes como pesticidas (Chu, 2003), fármacos (Huber, 2005), colorantes (Zhao, 2011), tensioactivos (Delanghe, 1991; Beltrán, 2000; Tehrani, 2012) y otros compuestos orgánicos xenobióticos (Álvarez, 2001), los cuales tienen muchas propiedades oxidantes indeseables para el tratamiento de aguas. El ozono, un poderoso oxidante capaz de degradar por oxidación muchos compuestos orgánicos (Rosen, 1973), se encuentra fácilmente disponible, es soluble en agua y fácilmente monitorizable. Se descompone en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O y no produce subproductos que necesitan ser eliminados; además, es desinfectante.

La ozonización altera la estructura molecular del tensioactivo, provocando cambios en su actividad superficial que se observan en su capacidad espumante y el incremento de su solubilidad en agua por los productos más polares resultantes de la oxidación (Calvosa, 1991). La toxicidad del tensioactivo aumenta cuando la permeabilidad de las células de las especies acuáticas aumenta en respuesta a la disminución de la tensión superficial (Hisano, 2010). Aunque la actividad superficial es destruida por la ozonización, una gran

carga orgánica permanece y es potencialmente contaminante (Glance, 1987). Muchos estudios han revelado que los subproductos resultantes de la ozonización pueden ser más tóxicos incluso que el compuesto original por sí mismo (Brambilla, 1993).

En este trabajo se ha investigado la ozonización de cuatro tensioactivos de diferentes familias: lineal alquilbenceno sulfonato (LAS), derivados de ácidos alquil éter carboxílicos (EC), alcoholes grasos etoxilados (FAE) y alquilpoliglucósidos (APG). Para comprender el impacto de las disoluciones ozonizadas en la toxicidad acuática, se han usado bacterias luminiscentes *V. fischeri* como microorganismos de prueba. Realmente hay poca información disponible sobre los efectos de la ozonización en la toxicidad acuática de estos importantes tensioactivos comerciales aniónicos y no iónicos comúnmente usados en las formulaciones detergentes.

Como regla general, *V. fischeri* es el microorganismo más sensible en los ensayos de toxicidad, comparado con *Daphnia magna* y las microalgas, las cuales son el organismo menos sensible. Por esto, *V. fischeri* fue la elección más adecuada para determinar la toxicidad de los tensioactivos (Jurado, 2012a).

Se usó la tensión superficial como indicador de la actividad superficial. Para investigar la relación entre la actividad superficial y la toxicidad acuática, se determinó la concentración de tensioactivo que inhibe el 50 % de la luminiscencia después de 15 min de exposición (llamado EC<sub>50</sub>). La tensión superficial a esta concentración (llamada  $\gamma_{tox}$ ) se usó como indicador del punto para el cual la toxicidad emerge.

Los tensioactivos con anillos aromáticos, como LAS-R<sub>11-14</sub>, o tensioactivos con grupos glucosídicos, APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, mostraron menor toxicidad. Mientras que grupos éter presentes en FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> y en EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, y derivados de ácidos carboxílicos presentes en EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, aumentan su toxicidad después de la ozonización.

### 5.3.3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

#### Tensioactivos

En este estudio se usaron cuatro diferentes familias de tensioactivos. El lineal alquilbenceno sulfonato LAS-R<sub>11-14</sub> suministrado por Petresa (Madrid, España), el tensioactivo aniónico derivado de un ácido alquil éter carboxílico EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> y el no iónico alcohol graso etoxilado FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>, suministrados por Kao Corporation S.A (Tokio, Japón), y el tensioactivo no iónico alquilpoliglucósido APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, manufacturado por Henkel KgaA (Düsseldorf, Alemania) y suministrado por Sigma (apartado 3.1).

#### Proceso de ozonización

El proceso de ozonización se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3.6.1.4. La concentración inicial de tensioactivo en el reactor fue de 80 mg/L, concentración superior a los correspondientes valores de CMC. La temperatura se mantuvo constante a 25 °C durante todo el experimento mediante la recirculación de agua desde un baño termostático al reactor encamisado. El pH de la disolución se midió usando un pH-metro (Modelo S47; Mettler Toledo). Para todos los ensayos se observan cambios en el pH durante la ozonización disminuyendo desde 7.5 a 4.5 aproximadamente después de 30 minutos de ozonización. Las soluciones de tensioactivo ozonizadas se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de toxicidad.

## Medidas de tensión superficial

La tensión superficial de la disolución durante el proceso de ozonización se midió entre 0 y 30 min, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2. Para las medidas se utilizó el tensiómetro modelo Tensiometer K11 de Krüss GmbH (Hamburgo, Alemania).

## Ensayos de toxicidad

Las soluciones de tensioactivo ozonizadas se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de toxicidad, usando el sistema LumiStox® 300 Dr. Bruno Lange GmbH and Co (Hamburgo, Alemania), que emplea bacterias luminiscentes *Vibrio fischeri*, de acuerdo a la Norma UNE-EN-ISO 11348-2:2009 (UNE-EN-ISO 11348-2: 2009) y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.

### 5.3.3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla V.17 se muestran los datos de toxicidad antes de la ozonización para los tensioactivos LAS-R<sub>11-14</sub>, EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> y APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>. El menos tóxico es el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub>, y el más tóxico el FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>. Diferentes autores (Hisano, 2010; Oya, 2008; Oya, 2010) han estudiado la influencia de la tensión superficial en la toxicidad, estableciendo un rango de valores para la tensión superficial correspondiente con la EC<sub>50</sub> para los diferentes ensayos de inhibición. La Figura V.36 representa las curvas de tensión superficial frente a la concentración del tensioactivo, así como la EC<sub>50</sub> encontrada para *V. fischeri* a 15 minutos de incubación de las muestras no ozonizadas. Para investigar la relación entre la tensión superficial y la toxicidad acuática, se usó  $\gamma_{tox}$  como indicador del punto al cual la toxicidad emerge (tensión superficial a EC<sub>50</sub>).  $\gamma_{tox}$  es independiente del tipo de tensioactivo (Oya, 2008). Estos resultados muestran que la actividad interfacial del tensioactivo está fuertemente relacionada con la toxicidad acuática, confirmando la predicción de Hisano y Oya (Hisano, 2010), y por lo tanto, el cambio en la actividad interfacial indica un cambio en la toxicidad durante la ozonización (Oya, 2010).

Tabla V.17.- Toxicidad antes de la ozonización y D<sub>50</sub> antes y después de la ozonización

Tensioactivo	Toxicidad <sup>a,*</sup> EC <sub>50</sub> , mg/L	$\gamma_{tox}^*$ , m/Nm	D <sub>50</sub> <sup>*</sup> , %		% Reducción de toxicidad
			Antes de ozonizar	Después de ozonizar	
LAS-R <sub>11-14</sub>	32.8 ± 3.0	49.1 ± 0.8	41 ± 4	53 ± 4	30.6
EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub>	14.1 ± 3.0 [b]	44.1 ± 0.7	17.7 ± 2.1	12.0 ± 0.9	-32.3
FAE-R <sub>12-14</sub> E <sub>11</sub>	12.7 ± 2.1 [c]	34.5 ± 1.2	15.8 ± 1.3	14.1 ± 0.9	-11.2
APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub>	16.0 ± 0.6 [d]	39.3 ± 0.9	20.0 ± 0.4	53.1 ± 0.9	165.5

\* Valores determinados con un intervalo de confianza basado en t-95%.

<sup>a</sup> Condiciones experimentales iniciales: concentración de tensioactivo = 80 mg/L; pH=7; Concentración NaCl= 2% peso.

[b] (Jurado, 2012b)

[c] (Jurado, 2009)

[d] (Jurado, 2012a)

Es de destacar que los valores de EC<sub>50</sub> para cada tensioactivo están por debajo de la tensión superficial de 50 mN/m para el rango de los valores de tensión superficial entre los cuales la EC<sub>50</sub> ha sido estudiada. Se encontró que el tensioactivo con mayor toxicidad y el menor valor de tensión superficial fue FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub>, y el de menor toxicidad y mayor valor de tensión superficial fue el LAS-R<sub>11-14</sub>. Los valores de  $\gamma_{tox}$  para los tensioactivos estudiados se encuentran entre 39.3 y 49.1 m/mN. Valores similares de  $\gamma_{tox}$  fueron encontrados por otros autores que investigaron la toxicidad del LAS en agua dulce y agua marina (Oya, 2008) y de alcoholes etoxilados (Oya, 2010).

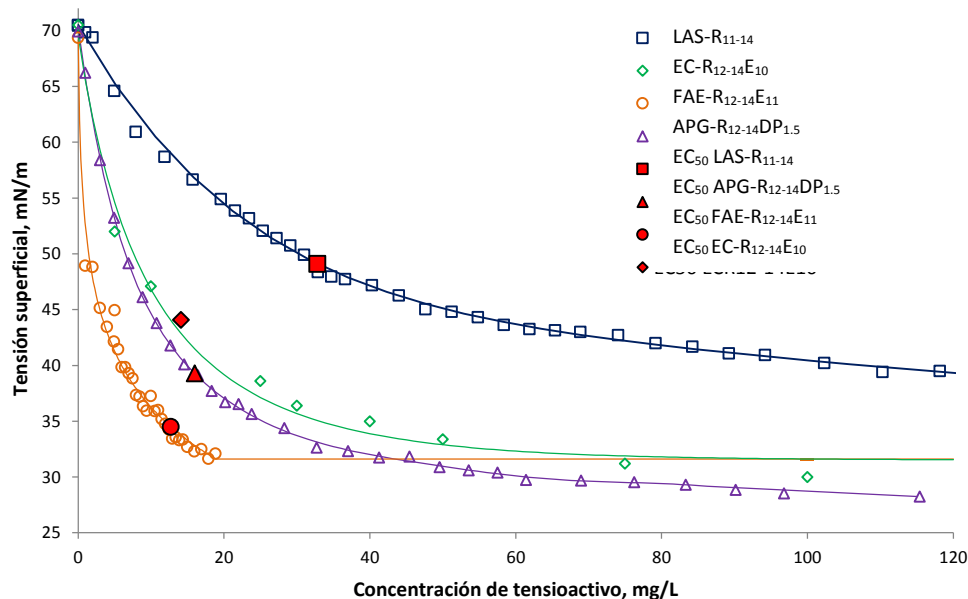


Figura V.36.- Tensión superficial frente a la concentración de tensioactivo y valores de EC<sub>50</sub> antes de la ozonización

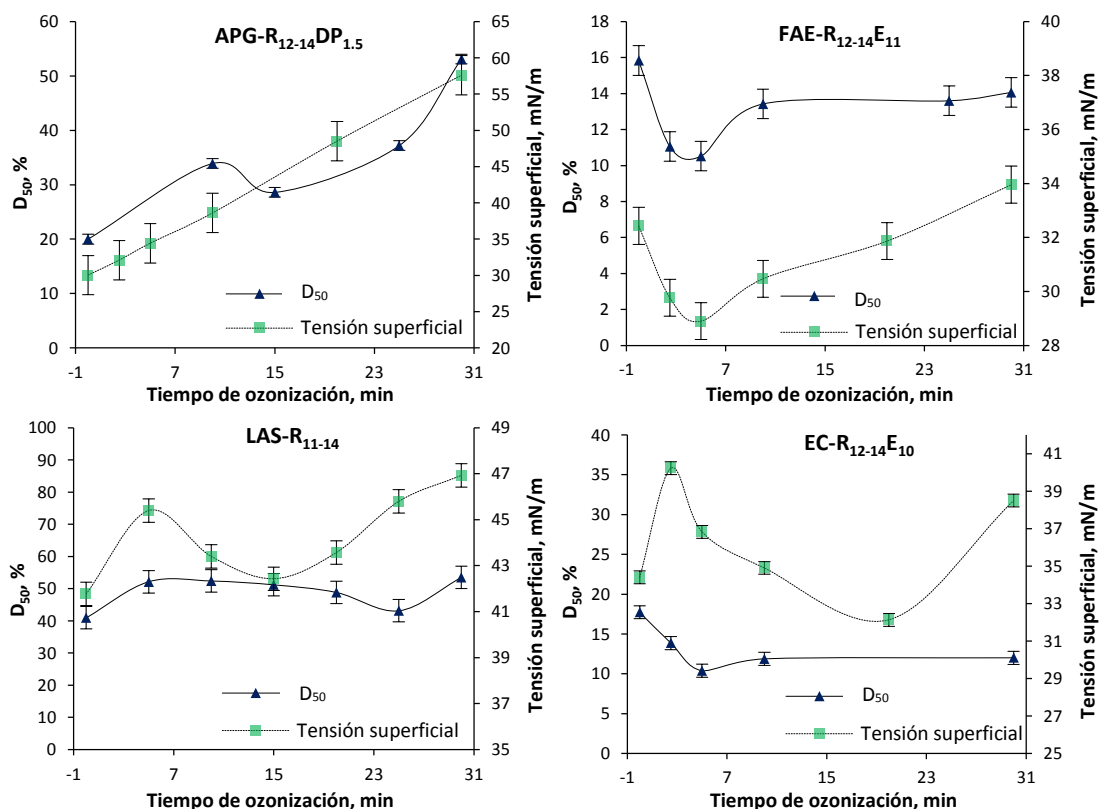


Figura V.37.- Evolución de la tensión superficial y el efecto de inhibición durante el tiempo de ozonización para los tensioactivos estudiados

Ni durante ni después del proceso de ozonización los valores de toxicidad pueden expresarse en términos de concentración, porque las muestras son de composición desconocida. Por lo tanto, para evaluar la toxicidad durante la ozonización, los valores de toxicidad de la muestra son expresados como D<sub>50</sub> y la variación en la toxicidad durante la

ozonización como la variación de este parámetro.  $D_{50}$  puede definirse como la dilución de la muestra expresada como el porcentaje que causa un 50% de inhibición en el organismo de prueba después de 15 min de exposición. Cuanto más bajo es el valor, más tóxica es la muestra. Los valores de  $D_{50}$  determinados para los diferentes tensioactivos antes y después de la ozonización de muestran en la Tabla V. 17.

Como Ledakowicz y col. predijeron (Ledakowicz, 2005), la toxicidad de los tensioactivos estudiados no siempre disminuye como se espera después de la degradación del tensioactivo mediante ozono. Se encontró que algunos productos intermedios de ozonización eran más tóxicos que el tensioactivo base. Tensioactivos con anillos aromáticos como el LAS-R<sub>11-14</sub>, o tensioactivos con grupos glucosídicos como APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, muestran menor toxicidad después de la ozonización. Mientras que, grupos éter presentes en el FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> y en el EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub> y derivados de ácidos carboxílicos presentes también en el EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, aumentan la toxicidad después de la ozonización.

En la Tabla V.17 se recogen los porcentajes de reducción de la toxicidad después de 30 minutos de ozonización para los tensioactivos estudiados.

### 5.3.3.6 CONCLUSIONES

La mayor reducción de toxicidad tras la ozonización se observa para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> y la menor para EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.

La Figura V.37 muestra el transcurso del cambio de la toxicidad. Sólo para el alquilpoliglucósido se observa una progresiva disminución en la toxicidad, excepto un ligero incremento alrededor de los 15 minutos desde el comienzo de la ozonización. El hecho de que un grupo disminuya o aumente la toxicidad puede ser explicado porque durante la ozonización se forman diferentes productos. Tensioactivos con grupos éter probablemente formen compuestos polietoxilados de cadena corta y ácidos, los cuales reducen la tensión superficial y de este modo aumenta la toxicidad; tal y como Ledakowicz encontró para tensioactivos de estructura similar (Ledakowicz, 2005). Estos resultados corroboran el hecho de que la tensión superficial es un buen indicador de la toxicidad del tensioactivo. La toxicidad del tensioactivo aumenta en respuesta a la disminución de la tensión superficial.

### 5.3.3.7 CONCLUSIONS

The greater toxicity reduction after ozonation is observed for the surfactant APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> and lower for EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.

Figure V.37 shows the time course of toxicity with ozonation time. Only the alkylpolyglucoside shows a progressive decline in toxicity, except for a slight increase around 15 min after the beginning of the ozonation. The fact that the presence of a group increases or decreases toxicity could be explained by the different products formed during ozonation. Surfactants with ether groups probably form short-chain polyethoxylated compounds and acids, possibly lower the surface-tension and thereby increase toxicity; similar to the ones found in similar structure surfactants by Ledakowicz (Ledakowicz, 2005). These results corroborate the fact that the surface tension is a good indicator of the toxicity of a surfactant. The toxicity of surfactants increases in response to decreased surface tension.



### 5.3.3.8 REFERENCIAS

- Alvarez, A., Diaper, C., Parsons, S. (2001). Partial oxidation by ozone to remove recalcitrance from wastewaters- a review. *Environmental Technology*, 22:409-427.
- Beltrán, F.J., García-Araya, J., Álvarez, P. (2000). Sodium dodecylbenzenesulfonate removal from water and wastewater. 2. Kinetics of the integrated ozone-activated sludge system. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39:2221-2227.
- Beltran-Herédia, J., Torregrosa, J., Domínguez, J.R., Pérez, J.A. (2001). Kinetics of the reaction between ozone and phenolic acids present in argo-industrial wastewaters. *Water Research*, 35:1077-1085.
- Beltrán, F.J. (2004). Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems. Lewis Publishers. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Brambilla, A., Calvosa, L., Monteverdi, A., Polesello, S., Rindone, B. (1993). Ozono oxidation of polyethoxylated alcohols. *Water Research*, 27:1313-1322.
- Buhler, R.E., Staehelin, J., Hoigné, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 1.  $\text{HO}_2/\text{O}_2^-$  and  $\text{HO}_3/\text{O}_3^-$  as intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 88(12):2560-2564.
- Calvosa, L., Monteverdi, A., Rindone, B., Riva, G. (1991). Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation. *Water Research*, 25:985-993.
- Chelme-Alaya, P., El-Din, M.G., Smith, D.W. (2010). Kinetic and mechanism of the degradation of two pesticides in aqueous solutions by ozonation. *Chemosphere*, 78: 557-562.
- Chu, W., Ching, M.H. (2003). Modeling the ozonation of 2,4 dichlorophoxyacetic acid through a kinetic approach. *Water Research*, 37:39-46.
- Delanghe, B., Merkras, C.I., Graham, N.J.D. (1991). Aqueous ozonation of surfactants: a review. *Ozone: Science & Engineering*, 13:639-673.
- Di Corcia, A., Casassa, F., Crescenzi, C., Marcomini, A., Samperi, R. (1999). Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters. *Environmental Science & Technology*, 22:4119-4125.
- Glance, W.H. (1987). Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science & Technology*, 21:224-230.
- Hisano, N., Oya, M. (2010). Effects of surface activity on aquatic toxicity of binary surfactants mixtures. *Journal of Oleo Science*, 59:589-599.
- Huber, M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mcardell, C., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T., Von Gunter, U. (2005). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewaters effluents: a pilot plant study. *Environmental Science & Technology*, 39:4290-4299.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-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 Science and Technology*, 59:2351-2358.

- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jiménez, J.L., Ríos, F. (2012a). Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and microalgae: A comparative study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(2):290-295.
- Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Lechuga, M., Ríos, F. (2012b). Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(1):1-7.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J. (1997). Kinetics of ozonation of non-ionic detergent in aqueous solutions. *Proceedings 13<sup>th</sup> Ozone World Congress*, 1:343-348, Kyoto.
- Ledakowicz, S., Perkowski, J., Bulska, A., Jamroz, J., Sencio, B. (2005). Ozonation impact on degradation and toxicity of non-ionic surfactants. *Ozone: Science & Engineering*, 27:437-445.
- Narkis, N., Schneider-Rothe, M. (1980). Ozone-Induced Biodegradability of Non-Ionic Surfactant. *Water Research*, 14:1225-1232.
- Oya, M., Yuka, T., Ishikawa, Y. (2008). Large decrease in acute toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in hard water and seawater by adding adsorbent. *Journal of Oleo Science*, 57(1):15-21.
- Oya, M., Hisano, N. (2010). Decreases in surface activities and aquatic toxicities of linear alkylbenzene sulfonate and alcohol ethoxylates during biodegradation. *Journal of Oleo Science*, 59(1):31-39.
- Pedit, J.A., Iwamasa, K.J., Miller, C.T., Glace, W.H. (1997). Development and application of a gas-liquid contactor model for simulating advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology*, 31:2791-2796.
- Rosen, H.M. (1973). Use of ozone and oxygen in advanced wastewaters treatment. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 45:2521-2536.
- Scott, M.J., Malcolm, N.J. (2000). Review: The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508:235-251.
- Stahelin, J., Buhler, R.E., Hoigné, J. (1984). Ozone decomposition in water studied by pulse-radiolysis. 2. OH and chain intermediates. *Journal of Physical Chemistry*, 88:5999-6004.
- Stahelin, J., Hoigné, J. (1985). Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science & Technology*, 19:1206-1213.
- Tehrani, A., Nikkar, H., Menger, F., Holmberg, K. (2012). Degradation of two persistent surfactants by UV-enhanced ozonation. *Journal of Surfactants and Detergents*, 15:59-66.
- Ungar, W.C., Jonas, K., Schwammlein, O., Leitzke. (1997). Selective degradation of surfactants with ozone. *Regional Conference on Ozone, UV Light, AOP in Water Treatment* (pp.29-56), Amsterdam.
- Zhao, W., Liu, F., Yang, Y., Tan, M., Zhao, D. (2011). Ozonation of cationic red X-GRL in aqueous solution: kinetics and modelling. *Journal of Hazardous Materials*, 187:526-533.



# Capítulo 6

## Conclusiones Generales

### 6.1 CONCLUSIONES GENERALES

A continuación se enumeran las conclusiones más relevantes obtenidas de los distintos trabajos presentados:

1. Se ha evidenciado la influencia de la concentración inicial de tensioactivo en su biodegradabilidad. De forma general los tensioactivos se biodegradan más fácilmente a menores concentraciones iniciales, así ocurre para todas las familias de tensioactivos estudiadas, lineal alquilbenceno sulfonato, derivados de ácidos alquil éter carboxílicos, nonilfenol polietoxilado, alcoholes grasos etoxilados, y alquilpoliglucósidos, excepto para los óxidos de amina para los que el efecto es el contrario.

Este fenómeno se ve reflejado en los parámetros característicos calculados para los perfiles de biodegradación, tales como  $V_M$ ,  $t_L$ ,  $t_{1/2}$ ,  $B$  y  $S_R$ . De modo que la velocidad media de biodegradación  $V_M$ , y biodegradabilidad  $B$ , son mayores para menores concentraciones iniciales y el tiempo de latencia  $t_L$ , tiempo de vida medio  $t_{1/2}$  y concentración residual de tensioactivo  $S_R$  son mayores.

2. Se ha comprobado que la influencia de la estructura del tensioactivo en la biodegradabilidad depende de la familia de tensioactivo estudiada. Para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y alquilpoliglucósidos, cuanto menor es la longitud de su cadena alquílica mayor es la biodegradabilidad. Para los alcoholes grasos etoxilados y óxidos de amina se obtuvo el resultado opuesto. También se obtuvo que la biodegradabilidad para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y alcoholes grasos etoxilados es mayor cuando su grado de etoxilación es mayor.

3. Para todos los tensioactivos estudiados, a excepción de los óxidos de amina, a concentraciones inferiores a 25 mg/L, los porcentajes de biodegradación primaria y/o final se encuentran cerca o por encima del 90%. La legislación actual requiere un nivel mínimo de biodegradación primaria superior al 80%, o una biodegradación final mayor del 60% para que el tensioactivo pueda considerarse como fácilmente biodegradable cuando se aplica el ensayo estático de biodegradación de la OCDE. Por tanto los tensioactivos estudiados pueden clasificarse como biodegradables a concentraciones inferiores a 25 mg/L. De todos ellos, y utilizando el parámetro de velocidad media de biodegradación  $V_M$  para su comparación, los alcoholes grasos etoxilados y especialmente el FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> son los más biodegradables, mientras que los derivados de éteres carboxílicos son los menos biodegradables.
4. La biodegradación para los tensioactivos alquilpoliglucósidos ocurre mediante una escisión central en la molécula, obteniéndose alcoholes y polisacáridos. Durante el proceso de biodegradación pueden observarse dos etapas: una primera etapa que se ajusta al modelo cinético de Quiroga y una segunda etapa que se ajusta a un modelo cinético de primer orden.
5. Los resultados de biodegradabilidad que se obtienen para cada tensioactivo dependen del ensayo empleado, ya que en cada uno de ellos los microorganismos utilizados y condiciones de operación son diferentes. Basándose en las consideraciones obtenidas en los trabajos presentados, se puede afirmar que el ensayo estático y el ensayo respirométrico son los más reproducibles y fáciles de llevar a cabo, y los que proporcionan mayor información.
6. Las bacterias *V. fischeri* son los organismos más sensible a los efectos tóxicos de las dos familias de tensioactivos estudiadas, alquilpoliglucósidos y derivados de ácidos alquil éter carboxílicos. Las microalgas *S. capricornutum* son las menos sensibles para la gran mayoría de ellos, mientras que para los microcrustáceos *D. magna*, estos tensioactivos presentan valores de toxicidad intermedios. Esto ocurre para todos los tensioactivos estudiados excepto para el EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, para el que los resultados son opuestos.
7. Se ha comprobado la influencia de la estructura de la molécula en la toxicidad; así la toxicidad es menor para los tensioactivos de menor longitud de cadena alquílica y en el caso de los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos es menor para los de mayor grado de etoxilación.
8. El tensioactivo más tóxico es el EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub>, mientras que el menos tóxico depende de la especie ensayada; para bacterias *V. fischeri* y *D. magna* el tensioactivo menos tóxico es el EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, y para microalgas *S. capricornutum* el menos tóxico es APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>. El tensioactivo de referencia LAS-R<sub>11-14</sub> presenta una toxicidad intermedia y es también el que presenta resultados más dispersos para las tres especies ensayadas.
9. Se obtuvo que las microalgas *S. capricornutum* son menos sensibles a los efectos tóxicos de las mezclas que a los de los tensioactivos de forma individual, por tanto se observa un efecto sinérgico en la toxicidad de las mezclas de estos tensioactivos.

Para estas mezclas de derivados de éteres carboxílicos el organismo más sensible es *D. magna*, a diferencia del caso de dichos tensioactivos de forma individual para los que lo son las bacterias *V. fischeri*. La mezcla menos tóxica es la formada por los tensioactivos que presentan menor toxicidad de forma individual, EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> y EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.

10. La biodegradabilidad y eliminación de los tensioactivos se ve favorecida por una ozonización previa. Se obtuvieron resultados favorables para el ensayo de biodegradación con *P. putida* de disoluciones ozonizadas de óxidos de amina (AO-R<sub>12</sub> y AO-R<sub>14</sub>), y para el ensayo de biodegradación estático con disoluciones ozonizadas de lineal alquilbenceno sulfonato LAS-R<sub>11-14</sub> y el alquilpoliglucósido APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>.
11. Se ha determinado la cinética de degradación por ozono para LAS-R<sub>11-14</sub> y APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, obteniéndose los parámetros del modelo y constantes cinéticas. Para el tensioactivo LAS-R<sub>11-14</sub> la concentración disminuye de forma exponencial con orden de reacción dos, mientras que para el APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> lo hace de forma lineal con orden de reacción uno.
12. En el estudio del impacto de la ozonización sobre la toxicidad de tensioactivos se concluyó que la toxicidad de los tensioactivos no siempre disminuye después de la ozonización. Para tensioactivos con anillos aromáticos como LAS-R<sub>11-14</sub> o con grupos glucosídicos como APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, la toxicidad es menor después de la ozonización. Sin embargo, para tensioactivos con grupos éter y derivados de ácidos carboxílicos presentes en FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> y/o EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, aumenta la toxicidad después de la ozonización, ya que se forman compuestos polietoxilados de cadena corta y ácidos que reducen la tensión superficial. La mayor reducción de toxicidad se obtuvo para el tensioactivo APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, y el mayor aumento de la toxicidad se obtuvo para el EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.



## 6.2 GENERAL CONCLUSIONS

Based on the research carried out, the following general conclusions were drawn:

1. The influence of the initial surfactant concentration on the biodegradability has been evidenced. For all the surfactants tested, linear alkylbenzene sulfonate, ether carboxylic derivatives, nonylphenol polyethoxylate, fatty alcohol ethoxylates, and alkylpolyglucosides, the greater the initial concentration is, the lower the biodegradability is, except for the amine oxides bases surfactants, for which the effect is opposite.

This phenomenon is reflected in the characteristic parameters of the biodegradation profiles, such as  $V_M$ ,  $t_L$ ,  $t_{1/2}$ ,  $B$  and  $S_R$ . Mean biodegradation rate  $V_M$ , and biodegradability  $B$ , are lower for higher initial concentrations. While latency time  $t_L$ , half-life time  $t_{1/2}$  and residual-surfactant concentration  $S_R$ , are higher.

2. It has been shown that the influence of the surfactant structure on the biodegradability depends on the kind of the surfactant studied. For the ether carboxylic derivative surfactants and alkylpolyglucosides, the biodegradability is higher when the alkyl chain is shorter. For the fatty-alcohol ethoxylated and amine-oxide based surfactants, the opposite results were obtained. It was also found that for ether carboxylic derivative surfactants and fatty-alcohol ethoxylated, the biodegradability is higher when its degree of ethoxylation is higher.
3. For all of the surfactants tested, except for amine-oxide based surfactants, at concentrations below 25 mg/L, the primary and/or ultimate biodegradation rates are near or above 90%. The surfactant can be considered readily biodegradable when the OECD screening test is applied, if the primary biodegradation is above 80% or the ultimate biodegradation exceed 60%, in accordance with current legislation. Therefore, the surfactants studies can be classified as biodegradable at concentration below 25 mg/L. Using the parameter of mean biodegradation rate,  $V_M$ , for the comparison of surfactant biodegradation, it is obtained that: the fatty-alcohols ethoxylated and especially the FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> are the most biodegradable surfactants studied while derivatives ether carboxylic the least biodegradable.
4. The biodegradation of alkylpolyglucosides occurs through a central scission in the molecule, obtaining alcohol and polysaccharides. During the biodegradation process, two stages were noted; these are better described with the Quiroga and first-order kinetic models, respectively.
5. Biodegradability results obtained for each surfactant depends on the assay employed; in each assay the microorganisms used and the operating conditions are different. Based on the considerations of the research presented, the screening test and the respirometry test are the most reproducible and the easiest to perform, and they supply more information.
6. Bacteria *V. fischeri* are the most sensitive organisms to the toxic effects of the ether carboxylic derivative surfactants and alkylpolyglucosides, and microalgae *S. capricornutum* are least sensitive to the majority of them; for the microcrustaceans



*D. magna*, these surfactants present intermediate values of toxicity. This occurs for all surfactants studied except for EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, for which the results are opposite.

7. It was found the influence of the molecule structure on the toxicity of surfactants; toxicity is lower for the surfactant with lower alkyl chain length, and in the case of alkyl ether carboxylic derivative surfactants, toxicity is smaller when the degree of ethoxylation is higher.
8. Surfactant EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>3</sub> is the most toxic, while the least toxic surfactant depends on the organism tested. For *V. fischeri* and *D. magna* the least toxic is EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub>, and for *S. capricornutum* the least toxic is APG-R<sub>8-10</sub>DP<sub>1.4</sub>. The surfactant LAS-R<sub>11-14</sub>, used as reference, has intermediate toxicity and shows more scattered results for the three test species.
9. It was observed that microalgae *S. capricornutum* are less sensitive to the toxic effect of the mixture than to the individual surfactants, therefore, there is a synergism in the co-occurrence of these surfactants. The most sensitive organism to the mixtures of ether carboxylic derivative surfactants are microcrustaceans *D. magna*, unlike the case of individual surfactants for which are the bacteria *V. fischeri*. Binary mixture measurements indicate that the least toxic mixture is formed by the surfactant having lower individual toxicity, EC-R<sub>8</sub>E<sub>8</sub> and EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.
10. The biodegradation and removing of surfactants is favored by a previous ozonation. Favorable results were obtained for the *P. putida* biodegradation test of ozonated solutions of amine-oxide based surfactants (AO-R<sub>12</sub> y AO-R<sub>14</sub>), and for the screening biodegradation test with ozonated solutions of the linear alkylbenzene sulfonate LAS-R<sub>11-14</sub> and the alkylpolyglucoside APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>.
11. The kinetics of degradation by ozone for LAS-R<sub>11-14</sub> and APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> was determined, the parameters and constants of the kinetics models were obtained. For the surfactant LAS-R<sub>11-14</sub> concentration decreases exponentially whereas for APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub> is lineal.
12. In the study on the impact of ozonation on the toxicity of surfactants, was concluded that the toxicity of surfactants not always decreases after ozonation. For surfactants with aromatic rings as LAS-R<sub>11-14</sub> or with glycosidic groups as APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, toxicity is lower after ozonation. However, for surfactants with ether groups and carboxylic acid derivatives present in FAE-R<sub>12-14</sub>E<sub>11</sub> and/or EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>, toxicity increases after ozonation. Short chain polyethoxylated compounds and acids are formed which reduce the surface-tension and thereby increases the toxicity. The greatest toxicity reduction was obtained for the surfactant APG-R<sub>12-14</sub>DP<sub>1.5</sub>, and the largest toxicity increase was obtained for the EC-R<sub>12-14</sub>E<sub>10</sub>.

## Lista de Tablas

<b>CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
Tabla I.1.- Principales tipos de tensioactivos utilizados (Sibila, 2008) .....	29
Tabla I.2.- Campos de aplicación de los tensioactivos en la industria (Ortega, 2009) .....	33
Tabla I.3.- Composición de algunos detergentes (Bailón, 2003) .....	35
Tabla I.4.- Concentraciones medias de tensioactivos aniónicos (MBAS) y de tensioactivos no iónicos (BiAS) en EDARs y en aguas de río .....	38
Tabla I.5.- Lista de métodos para determinar la biodegradabilidad final (mineralización) de compuestos.....	47
Tabla I.6.- Valores de IC <sub>50</sub> (mg/L) de diversos homólogos del LAS frente a <i>Daphnia magna</i> .....	55
Tabla I.7.- Datos comparativos de toxicidad frente a bacterias luminiscentes (EC <sub>50</sub> ) y frente a <i>Daphnia magna</i> (IC <sub>50</sub> ) para alcoholes grasos y nonilfenoles polietoxilados.....	56
Tabla I.8.- Relación estructura-toxicidad para tensioactivos aniónicos y no iónicos.....	56
Tabla I.9.-Tecnologías basadas en procesos de oxidación avanzada usadas para la depuración de aguas.....	566
Tabla I.10.- Principales aspectos positivos y negativos en la utilización de los procesos oxidativos avanzados para el tratamiento de efluentes (Polezi, 2003).....	58
Tabla I.11 Mecanismos de reacción en la ozonización: etapas de reacción y constantes cinéticas (Zhao, 2011).....	61
<b>CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3.- DETALLES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>81</b>
Tabla III.1.- Descripción de los tensioactivos utilizados .....	82
Tabla III.2.- Especificaciones Técnicas TOC-V CSH .....	104
Tabla III.3.- Recta de calibrado para la determinación de la DQO .....	109
<b>CAPÍTULO 4.- RESUMEN DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO 5.- TRABAJOS PUBLICADOS .....</b>	<b>131</b>
Tabla V.1.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub>	143

---

Tabla V.2.- Valores de los parámetros del ajuste para la cinética de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) etapa A, y del modelo de primer orden etapa B, para el tensioactivo no iónico APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	148
Tabla V.3.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación para los tensioactivos derivados de éteres carboxílicos.....	158
Tabla V.4.- Valores de toxicidad (95 % IC) para los ensayos con <i>V. fischeri</i> , <i>D.magna</i> y <i>S. capricornutum</i> .....	160
Tabla V.5.- Ventajas y desventajas de los ensayos de biodegradación aeróbica.....	178
Tabla V.6.- Datos de toxicidad aguda para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con <i>V. fischeri</i> .....	189
Tabla V.7.- Datos de toxicidad aguda para derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con <i>D. magna</i> .....	190
Tabla V.8.- Datos de toxicidad aguda para los derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS en el ensayo con <i>S. capricornutum</i> .....	190
Tabla V.9.- Concentración nominal y actual de tensioactivo en los ensayos de toxicidad.....	198
Tabla V.10.- Datos de toxicidad aguda (95% IC) para alquilpoliglucósidos en el ensayo con <i>V. fischeri</i> .....	200
Tabla V.11.- Datos de toxicidad aguda para alquilpoliglucósidos para el ensayo con <i>Daphnia magna</i> .....	201
Tabla V.12.- Datos de toxicidad aguda (95 % CI) para alquilpoliglucósidos en los ensayos con <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	201
Tabla V.13.- Resultados de ozonización para AO-R <sub>14</sub> .....	212
Tabla V.14.- Resultados de ozonización para AO-R <sub>12</sub> .....	212
Tabla V.15.- Parámetros del modelo de ajuste y constantes cinéticas.....	223
Tabla V.16.- Parámetros característicos de los perfiles de biodegradación durante la biodegradación con y sin ozonizar.....	226
Tabla V.17.- Toxicidad antes de la ozonización y D <sub>50</sub> antes y después de la ozonización.....	237
<b>CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>241</b>

# Lista de Figuras

<b>CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>27</b>
Figura I.1.- Estructura básica de un tensioactivo .....	27
Figura I.2.- Propiedades de los tensioactivos .....	31
Figura I.3.- Modificación de la tensión superficial en función de la concentración de de tensioactivo y formación de micelas .....	30
Figura I.4.- Consumo de tensioactivos por regiones (IHS, 2013) .....	35
Figura I.5.- Evolución de la producción de tensioactivos en la Unión Europea*, 2000-2011. (*Incluye Islandia, Noruega y Suiza) (CESIO, 2011).....	36
Figura I.6.- Vías de emisión de detergentes al medio ambiente .....	37
Figura I.7.- Estructura de la molécula del ozono .....	59
Figura I.8.- Reacciones de formación de radicales libres OH- .....	62
Figura I.9.- Ciclo de los mecanismos de descomposición del ozono en disolución acuosa iniciado por el ion hidroxilo. (Glance, 1986) .....	64
<b>CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3.- DETALLES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>81</b>
Figura III.1.- Esquema del método del plato para la mediad de la tensión superficial (Salager, 2005) .....	84
Figura III.2.- Determinación de CMC para EC-R <sub>8</sub> E <sub>8</sub> +EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>3</sub> mediante medidas de tensión superficial .....	85
Figura III.3.- Equipo utilizado en el ensayo dinámico de biodegradación.....	91
Figura III.4.- Perfil típico de biodegradación para el ensayo dinámico de biodegradación .....	93
Figura III.5.- Representación esquemática del equipo respirométrico .....	95
Figura III.6.- Recta de calibrado para el método simplificado de análisis para la determinación de sustancias activas al azul de metileno .....	100
Figura III.7.- Recta de calibrado por el método colorimétrico del yodo-yoduro.....	101
Figura III.8.- Recta de calibrado por el método de la antrona.....	102
Figura III.9.- Diagrama de Flujo TOC.....	103
Figura III.10.- Vista interior del equipo "TOC-V CSH" de la casa Shimadzu.....	105
Figura III.11.- Recta de calibrado para la DQO .....	110

Figura III.12.- Relación lineal entre la función $\Gamma$ y la concentración para el tensioactivo EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub> .....	115
Figura III.13.- Relación lineal entre % Efecto y la concentración para el tensioactivo APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	118
Figura III.14.- Relación lineal entre % Inhibición y la concentración para el tensioactivo APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	122
Figura III.15.- Esquema de ozonización para los ensayos estáticos de biodegradación .....	123
Figura III.16.- Esquema de ozonización general para muestras de tensioactivo. ....	124
<b>CAPÍTULO 4.- RESUMEN DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO 5.- TRABAJOS PUBLICADOS.....</b>	<b>131</b>
Figura V.1.- Curva de crecimiento de unidades formadoras de colonias para APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> a 15 mg/L .....	140
Figura V.2.- Cromatograma para APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	141
Figura V.3.- Evolución de la concentración residual de APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> durante el tiempo de biodegradación para diferentes concentraciones iniciales de tensioactivo .....	141
Figura V.4.- Dependencia de la biodegradabilidad con la concentración de tensioactivo .....	143
Figura V.5.- Evolución de la biodegradación última para APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	144
Figura V.6.- Evolución del porcentaje de biodegradación primaria y última para APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> .....	145
Figura V.7.- Rutas de biodegradación propuestas para APGs.....	146
Figura V.8.- Evolución de la concentración de APG-R <sub>8-14</sub> DP <sub>1.3</sub> durante el ensayo de biodegradación. La línea continua representa la curva ajustada de acuerdo con el modelo de Quiroga y Sales (Quiroga, 1991) y de primer orden para las etapas A y B respectivamente .....	147
Figura V.9.- Tensión superficial frente a concentración de tensioactivo EC-R <sub>12-14</sub> E <sub>10</sub> . Temperatura 25°C.....	156
Figura V.10.- Evolución de la biodegradación última durante el periodo de biodegradación. ....	158
Figura V.11.- Efecto de la estructura del tensioactivo en la biodegradación última .....	159
Figura V.12.- Resultados del ensayo estático de biodegradación. Influencia de la concentración inicial .....	171
Figura V.13.- Resultados del ensayo estático de biodegradación. Influencia de la longitud de la cadena alquílica y del grado de etoxilación .....	172
Figura V.14.- Resultados para el ensayo dinámico de biodegradación .....	173
Figura V.15.- Resultados para el ensayo respirométrico de biodegradación. Influencia de la longitud de cadena alquílica, grado de etoxilación y número medio de moléculas de glucosa .....	174
Figura V.16.- Resultados para el ensayo respirométrico de biodegradación. Influencia de la concentración inicial.....	174
Figura V.17.- Resultados ensayo de biodegradación con <i>P. putida</i> a 30 mg/L para los óxidos de amina.....	175
Figura V.18.- Resultados ensayo de biodegradación con <i>P. putida</i> para el tensioactivo AO-R <sub>12</sub> . Efecto de la concentración .....	175
Figura V.19.- Tiempo de latencia para la concentración inicial de 25 mg/L.....	177
Figura V.20.- Velocidad media de biodegradación para la concentración inicial de 25 mg/L .....	177
Figura V.21.- Relación lineal entre la función $\Gamma$ y la concentración de acuerdo a la Ecuación V.10 .....	189
Figura V.22.- Relación lineal entre el % de efecto y la concentración para el ensayo con <i>D. magna</i> .....	190
Figura V.23.- Relación lineal entre en % de inhibición y concentración para los ensayos con <i>S. capricornutum</i> .....	190
Figura V.24.- Toxicidad para derivados de ácidos alquil éter carboxílicos y LAS con <i>V. fischeri</i> , <i>D. magna</i> y <i>S. capricornutum</i> .....	191
Figura V.25.- Estructura de los alquilpoliglucósidos.....	197
Figura V.26.- Relación lineal entre la función $\Gamma$ y la concentración de acuerdo a la Ecuación V.15 .....	200

Figura V.27.- Relación lineal entre el % de efecto y la concentración para los ensayos con <i>Daphnia magna</i> .....	200
Figura V.28.- Relación lineal entre en % de inhibición y concentración para los ensayos con <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	201
Figura V.29.- Datos de toxicidad para alquilpoliglucósidos usando <i>V. fischeri</i> , <i>D. magna</i> y <i>S. capricornutum</i> .....	202
Figura V.30.- Comparación de la eficiencia de biodegradación en los ensayos con <i>P. putida</i> con y sin ozonización .....	213
Figura V.31.- Efecto de la ozonización en la descomposición de las soluciones acuosas de APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub> y LAS-R <sub>11-14</sub> en función del tiempo de ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C. Modelo basado en las Ecuaciones V.18 y V.19 .....	224
Figura V.32.- Porcentaje de mineralización de las soluciones acuosas de APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub> y LAS-R <sub>11-14</sub> en función del tiempo de ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C..	224
Figura V.33.- Evolución de la tensión superficial durante la ozonización. Caudal de ozono 5 L/h, temperatura 25 °C.....	225
Figura V.34.- Eliminación de tensioactivos mediante biodegradación, y ozonización más biodegradación en función del tiempo para los tensioactivos APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub> y LAS-R <sub>11-14</sub> .....	226
Figura V.35.- Mineralización de tensioactivos mediante biodegradación, y ozonización más biodegradación en función del tiempo para los tensioactivos APG-R <sub>12-14</sub> DP <sub>1.5</sub> y LAS-R <sub>11-14</sub> .....	227
Figura V.36.- Tensión superficial frente a la concentración de tensioactivo y valores de EC <sub>50</sub> antes de la ozonización.....	238
Figura V.37.- Evolución de la tensión superficial y el efecto de inhibición durante el tiempo de ozonización para los tensioactivos estudiados.....	238
<b>CAPÍTULO 6.- CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>243</b>



# Lista de Publicaciones

## 1.- ARTÍCULOS EN REVISTAS

1. Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jiménez, J.L., Ríos, F. (2011). Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation test. *Water Environment Research*, 83(2):154-161.
2. Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Ríos, F. (2011). Ecotoxicity of anionic surfactants AKYPO®. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 144:497-505.
3. Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Núñez-Olea, J., Lechuga, M., Jiménez, J.L., Ríos, F. (2012). Acute toxicity of alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Microalgae: a comparative study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(2):290-295.
4. Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Lechuga, M., Ríos, F. Environmental impact of ether carboxylic derivative surfactants. (2012). *Journal of Surfactants and Detergents*, 15(1):1-7.
5. Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Fernández-Arteaga, A., Burgos, A., Ríos, F. (2012). Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants. *Procedia Engineering*, 42:1038-1044.
6. Lechuga, M., Fernández-Arteaga, A., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Burgos, a., Ríos, F. (2013). Ozonation of anionic and non-ionic surfactants in aqueous solutions: impact on aquatic toxicity. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(5):779-784.



7. Lechuga, M., Fernández-Arteaga, A., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Burgos, a., Ríos, F. (2014). Combined use of ozonation and biodegradation of anionic and non-ionic surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(2):363-370.
8. Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Fernández-Arteaga, A., Ríos, F., Lechuga, M. Ecotoxicological assessment of mixtures of ether carboxylic derivative and amine-oxide-based non-ionic surfactants on the aquatic environment. *Journal of Surfactants and Detergents*. Aceptado 14 de Julio de 2014.
9. Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Núñez-Olea, J., Ríos, F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Journal of Surfactants and Detergents*. En revision.

## 2.-CAPITULOS DE LIBRO

1. Jurado, E., Fernández-Serrano, M., Ríos, F., Lechuga, M. (2013). Aerobic biodegradation of surfactants. In R. Chamy, F. Rosenkranz (Eds.), *Biodegradation - Life of Science*. (pp.66-81). InTech, Rijeka.

## 3.- COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, F. Ríos and R. Rueda. Acute toxicity of surfactants to aquatic organisms. BioMicroWorld 2011. IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Torremolinos, España, 14-16 Septiembre 2011.
2. M. Fernández-Serrano, M. Lechuga, A. Arteaga, F. Ríos. Estudio de la ecotoxicidad y la biodegradabilidad de tensioactivos para su inclusión en la formulación de detergentes. II Jornadas Doctorales de Investigadores. Interculturabilidad y Ciencia. Granada, España, 3-5 Octubre 2011.
3. M. Fernández-Serrano, E. Jurado, M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, F. Ríos. Biodegradation and toxicity of surfactants by *Pseudomonas putida*. 12<sup>th</sup> Mediterranean Congress of Chemical Engineering. Barcelona, España, 15-18 Noviembre 2011.
4. M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, A. Fernández-Arteaga, E. Jurado, F. Ríos. Influence of ozonation processes on the toxicity of amine-oxide-based surfactant. ANQUE 2012. International Congress of Chemical Engineering. Sevilla, España, 24-27 Junio 2012.
5. M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Fernández-Arteaga, A. Burgos, F. Ríos. Influence of ozonation processes on the microbial degradation of surfactants. CHISA 2012. 20<sup>th</sup> International Congress of Chemical and Process Engineering. 15<sup>th</sup> Conference Press. Praga, República Checa, 25-29 Agosto 2012.
6. M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado, A. Fernández-Arteaga, J.M. Herrera, M. Góngora, A. Burgos, F. Ríos. Influencia de los procesos de ozonización en la biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales. META 2012. X Reunión de la Mesa Española de Tratamiento de Aguas. Almería, España, 4-6 Octubre 2012.

7. F. Ríos, M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, A. Burgos. Oxidation by ozone for removing surfactants from wastewater. Impact on the toxicity. GREEN-TECH Workshop Sustainable water treatment technologies: achievements, perspectives, constraints. Girona, España, 10-11 Diciembre 2012.
8. F. Ríos, A. Burgos, M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado. Influence of ozonation processes on the biodegradability of non-ionic surfactants. CICTA 2013. 9<sup>th</sup> Iberian and 6<sup>th</sup> Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology. Valencia, España, 1-4 Julio 2013.
9. F. Ríos, A. Burgos, A. Fernández-Arteaga, M. Lechuga, M. Fernández-Serrano, E. Jurado. Degradation of anionic and non-ionic surfactants by ozone. EAAOP-2013. 3<sup>rd</sup> European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes. Almería, España, 27-30 Octubre 2013.
10. F. Ríos, M. Olak-Kucharczyk, M. Gmurek, S. Ledakowicz. Degradation of anionic surfactants by photolysis and advanced oxidation process using hydroxyl radicals. EAAOP-2013. 3<sup>rd</sup> European Conference on Environmental Applications of Advanced Oxidation Processes. Almería, España, 27-30 Octubre 2013.
11. F. Ríos, M. Lechuga, A. Fernández-Arteaga, M. Fernández-Serrano. Acute toxicity of the non-ionic surfactants glycerine polyoxyethylene esters to aquatic organisms. SIS 2014. 20<sup>th</sup> International Symposium on Surfactants in Solution. Coimbra, Portugal, 22-27 Junio 2014.
12. F. Ríos, A. Fernández-Arteaga, M. Lechuga, E. Jurado, M. Fernández-Serrano. Aerobic biodegradation of amine-oxide-based surfactants. SIS 2014. 20<sup>th</sup> International Symposium on Surfactants in Solution. Coimbra, Portugal, 22-27 Junio 2014.

