



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería**

Máster en Ingeniería Ambiental

MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD APARENTE DEL  
HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH) MEDIANTE LA APLICACIÓN  
DE LÍQUIDOS IÓNICOS Y SURFACTANTES PARA SU POTENCIAL  
APLICACIÓN EN REMEDIACIÓN DE SUELOS

Presentado por:

María Zoe Chaos Carballo

Santiago de Compostela, Julio 2020



**M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez**, Profesora Titular del Departamento de Edafología y Química Agrícola y **Dr. María Balseiro Romero**, Investigadora Postdoctoral asociada del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo, titulado “MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD APARENTE DEL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS Y SURFACTANTES PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN REMEDIACIÓN DE SUELOS” ha sido realizado por M<sup>a</sup> Zoe Chaos Carballo bajo su dirección y que, considerando que representa el Trabajo de Fin de Máster para la obtención del título de Máster en Ingeniería Ambiental, autorizan su presentación.

Santiago de Compostela, 6 de Julio de 2020

**Las tutoras**

**La alumna**

M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez   María Balseiro Romero   M<sup>a</sup> Zoe Chaos Carballo

## RESUMEN

La baja biodisponibilidad del hexaclorociclohexano (HCH) afecta a la efectividad de procesos de biorremediación de suelos contaminados por HCH. Para aumentar la solubilidad aparente del HCH y potenciar su biodisponibilidad, se estudió el efecto de la acción micelar de una gran variedad de líquidos iónicos con actividad surfactante (*i.e.* *Surface-Active Ionic Liquids* o *SAILS*) y surfactantes convencionales sobre la solubilidad de HCH. Se prepararon disoluciones de *SAILS*/surfactantes y HCH (a una concentración *ca.* 10 veces su límite de solubilidad) utilizando dos concentraciones distintas de *SAILS*/surfactantes (siempre  $>CMC$ ). Los resultados varían según el isómero de HCH, el *SAIL*/surfactante y la concentración utilizada. De forma adicional, se estudió la ecotoxicidad de los *SAILS*/surfactantes en dos especies vegetales. Este estudio demuestra la potencialidad de los *SAILS* y surfactantes para su aplicación en biorremediación de suelos contaminados por HCH y propone varios *SAILS* para futuras investigaciones.

---

## ABSTRACT

*The low bioavailability of hexachlorocyclohexane (HCH) affects the effectiveness of bioremediation processes of HCH-contaminated soils. The effect of the micellar action of a variety of surfactant-active ionic liquids (i.e. SAILS) and conventional surfactants on the apparent solubility of HCH and its bioavailability was studied. Solutions of SAILS/surfactants and HCH (at a concentration ca. 10 times its solubility limit) were prepared using two different concentrations of SAILS/surfactants (always  $>CMC$ ). The results varied according to the HCH isomer, the SAIL/surfactant and the concentration used. Additionally, the ecotoxicity of SAILS/surfactants was studied in two plant species. This study demonstrates the potential of SAILS and surfactants for their application in bioremediation of HCH-contaminated soils and proposes several SAILS for future research.*

## AGRADECIMIENTOS

Después de varios meses de constancia y tenacidad, este trabajo llega a su fin y con él, el Máster en Ingeniería Ambiental 2018-2020. En este punto, me gustaría agradecer a algunas personas que me han ayudado, apoyado y animado durante este tiempo.

En primer lugar, quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento a mis tutoras. A Carmela, por haberme dado esta oportunidad y haberme ayudado siempre que lo he necesitado, y en especial a María, por ser una brillante investigadora y perfecta compañera, sin su ayuda este trabajo no habría sido posible.

A mi familia, por apoyarme en los momentos más difíciles y enseñarme a confiar en mi cuando yo no he sabido hacerlo. Me gustaría hacer una mención especial a mi abuela, que ha luchado y sigue luchando porque su hija y nietas tengan una vida mejor que la que ella pudo tener; ha sido, es y siempre será un ejemplo a seguir.

No son menos importantes, todos mis amigos y compañeros, que han hecho que este camino sea más fácil y divertido. Mis amigos del máster, Álex, Pablo, Diego y Tania; mis fantásticas amigas de la carrera, Vera e Iria; y mis queridísimas amigas de la infancia, Virginia, Sara, Paula y July.

Por último, me gustaría añadir unos versos de un poema de Joan Margarit llamado “La libertad” que considero necesarios para expresar la gratitud que siento al finalizar esta etapa, especialmente después de los momentos tan duros que hemos vivido a causa de la Covid-19:

*“Es la razón de nuestra vida,  
dijimos, estudiantes soñadores.  
La razón de los viejos, matizamos ahora,  
su única y escéptica esperanza.  
La libertad es un extraño viaje.  
(...)  
Una forma de amor, la libertad. “*

# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>  | <b>7</b>  |
| <b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1. EL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH)  | 9         |
| 1.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL HCH  | 10        |
| 1.3. COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO   | 11        |
| 1.4. BIODEGRADACIÓN DE HCH Y SU BIODISPONIBILIDAD COMO FACTOR LIMITANTE   | 13        |
| 1.5. CONTAMINACIÓN POR HCH: DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ACTUAL                                     | 14        |
| 1.6. TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HCH (BIORREMEDIACIÓN)                                   | 15        |
| 1.7. LÍQUIDOS IÓNICOS: APLICACIÓN POTENCIAL EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS                            | 17        |
| 1.7.1. LÍQUIDOS IÓNICOS CON ACTIVIDAD SURFACTANTE ( <i>SURFACE-ACTIVE IONIC LIQUIDS</i> O <i>SAILs</i> )        | 19        |
| <b>CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>22</b> |
| 2.1. <i>SURFACE-ACTIVE IONIC LIQUIDS (SAILS)</i>  | 22        |
| 2.2. ENSAYOS <i>BATCH</i> DE MODIFICACIÓN DE SOLUBILIDAD DE HCH EN DISOLUCIÓN                                   | 30        |
| 2.2.1. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE HCH MEDIANTE GC/MS  | 31        |
| 2.3. ECOTOXICIDAD DE LOS <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO) | 32        |
| 2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS  | 32        |
| <b>CAPÍTULO III: RESULTADOS</b>   | <b>33</b> |
| 3.1. MEDICIÓN DE PH Y C.E. DE LOS <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES   | 33        |
| 3.2. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD EN AGUA DE LOS ISÓMEROS DE HCH EN PRESENCIA DE <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES  | 34        |
| 3.2.1. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL CONJUNTO DE ISÓMEROS DE HCH   | 36        |
| 3.2.2. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE CADA ISÓMERO DE HCH  | 38        |
| 3.2.3. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE HCH SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DEL <i>SAIL</i> /SURFACTANTE                | 47        |
| 3.3. ECOTOXICIDAD DE LOS <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO) | 47        |
| 3.4. EFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE UN <i>SAIL</i> CATIONICO (1oLiLYTE C1EG) Y UN SURFACTANTE ANIÓNICO (DBS)  | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>   | <b>54</b> |
| <b>4.1. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE HCH EN PRESENCIA DE SAILs Y SURFACTANTES</b>                          | <b>54</b> |
| <b>4.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SAIL/SURFACTANTE SOBRE SU CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE HCH</b>          | <b>55</b> |
| <b>4.3. EFECTO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SAIL/SURFACTANTE SOBRE SU CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN</b>           | <b>56</b> |
| 4.3.1. EFECTO DE LA REGIÓN POLAR (HIDRÓFILA)  | 56        |
| 4.3.2. EFECTO DE LA REGIÓN APOLAR (HIDRÓFOBA)   | 57        |
| 4.3.3. EFECTO DEL PARÁMETRO HLB EN SURFACTANTES   | 58        |
| <b>4.4. ECOTOXICIDAD DE LOS SAILs Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO)</b> | <b>58</b> |
| 4.4.1. EFECTO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SAIL/SURFACTANTE SOBRE SU ECOTOXICIDAD                               | 59        |
| 4.4.2. EFECTO DEL PH Y LA C.E. DE LOS SAILs Y SURFACTANTES SOBRE SU ECOTOXICIDAD                                | 60        |
| <b>4.5. EFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE UN SAIL CATIÓNICO (IOLiLYTE C1EG) Y UN SURFACTANTE ANIÓNICO (DBS)</b>  | <b>60</b> |
| <b>4.6. MARCO DE APLICACIÓN DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS Y PERSPECTIVAS DE FUTURO</b>                                | <b>61</b> |
| <b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</b>   | <b>65</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>67</b> |
| <b>ANEXO I: FOTOGRAFÍAS DE LOS SIGNOS DE TOXICIDAD OBSERVADOS EN EL ENSAYO DE ECOTOXICIDAD EN PLANTAS</b>       | <b>73</b> |

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La producción agrícola ha aumentado considerablemente en las últimas décadas para garantizar el suministro de alimentos de una población creciente a ritmo exponencial. La lucha química es la más utilizada para combatir las plagas y, en cierto modo, es la que ha permitido un mejor rendimiento de las cosechas. A pesar de esto, el uso incontrolado de los plaguicidas y su alta persistencia y toxicidad han generado y generan graves problemas ambientales. Una vez aplicados, se dispersan a través del suelo, agua y aire haciendo que el daño ambiental sea mayor e incluso pudiendo llegar a la cadena alimentaria. El uso de plaguicidas es tal que anualmente se consume más de medio kilo de plaguicida por habitante del planeta (Coscollá, 2013).

Dentro del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), aprobado en 2001 y en vigor desde 2004, se reconocen numerosos pesticidas como contaminantes orgánicos persistentes (conocidos como *POPs* o *Persistent Organic Pollutants*) (consultar: <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>). En la lista inicial se incluyen 12 *POPs*, de los cuales 9 son pesticidas organoclorados (aldrina, clordano, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenceno o HCB, mirex, toxafeno y diclorodifeniltricloroetano o DDT). Esta lista fue aumentando con los años y en 2009 se incluyeron en ella tres de los isómeros de hexaclorociclohexano o HCH: Lindano ( $\gamma$ -HCH),  $\alpha$ -HCH y  $\beta$ -HCH. Como *POP*, el HCH tiene una elevada persistencia en el medio, altas tasas de bioacumulación, alta toxicidad y capacidad para transportarse a largas distancias. Estas características, junto con un uso incontrolado del lindano en las últimas 5 décadas como plaguicida y una mala gestión de los subproductos no deseados generados en su fabricación (en su mayoría, otros isómeros de HCH), han desembocado en un grave episodio de contaminación de suelos a escala mundial. Así pues, se hace necesaria una mayor investigación en tecnologías sostenibles aplicadas a la remediación de suelos contaminados por residuos de HCH. En concreto, la biodegradación de estos compuestos por parte de microorganismos adaptados y con capacidades específicas resulta una tecnología muy prometedora y respetuosa con el medio ambiente. Si bien, dada la fuerte adsorción que sufren las moléculas de HCH al suelo, es necesario potenciar su biodisponibilidad para favorecer su posterior degradación, en la medida que se minimicen al máximo los riesgos de lixiviación.

Los líquidos iónicos con actividad surfactante, conocidos como *Surface-Active Ionic Liquids* o *SAILs*, han demostrado ser compuestos eficientes y competitivos frente a los surfactantes convencionales, muy utilizados en remediación de suelos para potenciar la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos hidrófobos. En calidad de surfactantes, podrían actuar como agentes movilizadores de HCH, aumentando su solubilidad aparente y, en consecuencia, su biodisponibilidad.

En este marco, el objetivo general del presente proyecto es contribuir al avance de las técnicas de biodegradación de HCH, mediante métodos que incrementen su biodisponibilidad en suelos contaminados. Los objetivos específicos son:

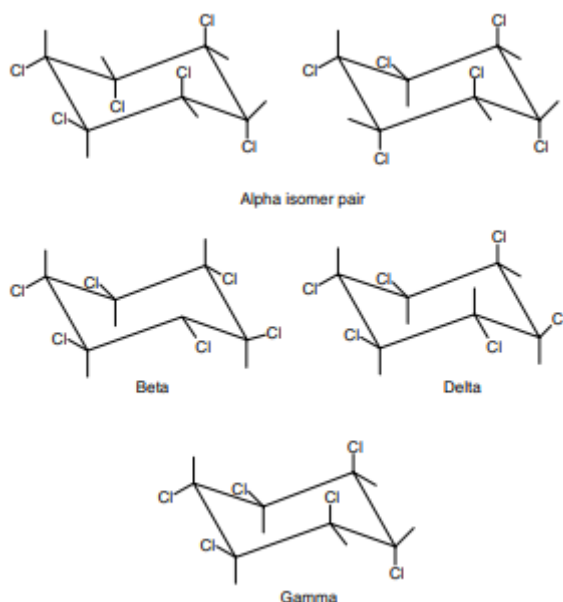
1. Evaluar la capacidad de los líquidos iónicos para modificar la solubilidad aparente del HCH y definir las propiedades de las que depende. Para ello, se estudiará la influencia de una gran variedad de compuestos, con diferentes propiedades físico-químicas y estructuras, sobre la solubilidad de HCH en agua mediante ensayos tipo *batch*.
2. Evaluar la ecotoxicidad de una selección de líquidos iónicos mediante ensayos de germinación y crecimiento temprano de dos especies vegetales.
3. Por último, a partir de los resultados de los puntos anteriores, seleccionar aquellos líquidos iónicos con potencial aplicación en la mejora de la biodisponibilidad de HCH en suelos contaminados y su biorremediación.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. EL HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH)

El hexaclorociclohexano o HCH es un compuesto organoclorado sintético que fue ampliamente utilizado después de la Segunda Guerra Mundial. Fue utilizado en la agricultura, como pesticida de amplio espectro, y en medicina, como tratamiento contra la sarna y los piojos (Vega, 2016).

La síntesis de HCH consiste en la fotocloración del benceno, reacción que da lugar a 8 estereoisómeros: (+)- $\alpha$ -HCH, (-)- $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH,  $\delta$ -HCH,  $\eta$ -HCH,  $\theta$ -HCH y  $\varepsilon$ -HCH. Se diferencian entre sí por la posición de los átomos de cloro, axial o ecuatorial, alrededor del anillo ciclohexano (ver Fig. 1).



**Fig. 1** Estructura química de los isómeros de HCH. Las posiciones axiales (a) o ecuatoriales (e) de los átomos de Cl son las siguientes:  $\alpha$ -HCH (aaeeee),  $\beta$ -HCH (eeeee),  $\gamma$ -HCH (aaae),  $\delta$ -HCH (aeeee),  $\eta$ -HCH (aeae),  $\theta$ -HCH (aeae) y  $\varepsilon$ -HCH (aeae). Imagen de Philips (2005).

En un inicio, el HCH se comercializaba como una mezcla de isómeros conocida como HCH-técnico (CAS *Registry* No. 608-73-1). Esta mezcla contenía 55-80% de  $\alpha$ -HCH, 5-14% de  $\beta$ -HCH, 8-15% de  $\gamma$ -HCH, 2-16% de  $\delta$ -HCH y una pequeña proporción del resto de isómeros. Sin embargo, el HCH técnico alteraba las propiedades organolépticas de los cultivos. Esto, y el hecho de descubrirse que el  $\gamma$ -HCH era el único isómero con actividad insecticida real, provocó que las empresas empezaran a aislarlo y a comercializarlo bajo

el nombre de lindano (99% de  $\gamma$ -HCH) (CAS Registry No. 58-89-9) (Mackay et al., 2006; Vega et al., 2016).

## 1.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL HCH

El HCH es un sólido blanco, cristalino, de masa molecular  $290,8 \text{ g mol}^{-1}$  y un olor muy característico (Mackay et al., 2006).  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HCH (lindano) fueron incluidos en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes porque cumplen con los criterios establecidos en el Anexo D del Convenio: son persistentes, bioacumulables, tóxicos y pueden recorrer largas distancias (Vega, 2016). Las propiedades físico-químicas varían entre los isómeros de HCH (ver Tabla 1). Concretamente, la solubilidad en agua del HCH, aunque es baja de forma general, también cambia según el isómero. Los valores recogidos en la bibliografía son muy variables, pero siempre mantienen el mismo orden de magnitud:  $\delta$ -HCH >  $\gamma$ -HCH >  $\alpha$ -HCH >  $\beta$ -HCH (Rodríguez Garrido, 2009) (ver Tabla 1).

**Tabla 1** Propiedades físico-químicas de los distintos isómeros de hexaclorociclohexano (HCH). Valores expresados como (media  $\pm$  desviación típica). Tabla adaptada de Willett et al. (1998). <sup>1</sup>Solubilidad determinada por Rodríguez Garrido (2009).

| Propiedad                      | $\alpha$                       | $\beta$                        | $\gamma$                       | $\delta$             |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| <b>Punto de fusión (°C)</b>    | 159-160                        | 309 - 310                      | 112 - 113                      | 138 - 139            |
| <b>Presión de vapor</b>        | $(1,6 \pm 0,9) \times 10^{-2}$ | $(4,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ | $(5,3 \pm 1,4) \times 10^{-3}$ | $2,1 \times 10^{-3}$ |
| <b>logK<sub>ow</sub></b>       | $3,9 \pm 0,2$                  | $3,9 \pm 0,1$                  | $3,7 \pm 0,5$                  | $4,1 \pm 0,02$       |
| <b>FBC en humanos</b>          | $20 \pm 8$                     | $527 \pm 140$                  | $19 \pm 9$                     | 8,5                  |
| <b>Solubilidad<sup>1</sup></b> | $2,38 \pm 0,54$                | $0,20 \pm 0,06$                | $4,94 \pm 1,11$                | $5,61 \pm 0,76$      |

Las diferencias entre los isómeros se deben principalmente a las distintas posiciones axiales/ecuatoriales de los átomos de Cl (Fig. 1). Por ejemplo,  $\beta$ -HCH tiene todos los átomos de Cl en posición ecuatorial, lo cual le confiere mayor estabilidad física y metabólica y mayor compactación molecular (Mrema et al., 2013; Rodríguez Garrido, 2009); esta estabilidad se traduce en una mayor persistencia ambiental y biológica.

Otra de las propiedades de los isómeros de HCH es que pueden sufrir isomerización ya sea por procesos bióticos o abióticos. La isomerización juega un papel importante en la estabilidad y persistencia de los isómeros de HCH en los suelos contaminados cambiando las concentraciones relativas de los isómeros sin reducir la concentración total de HCH (Phillips et al., 2005).

### **1.3. COMPORTAMIENTO EN EL MEDIO**

El destino medioambiental de los compuestos orgánicos en general, va a depender de sus propiedades físico-químicas y de la naturaleza del medio. En el caso concreto de los pesticidas, tras su aplicación, sólo una pequeña parte llega al organismo objetivo; la parte restante se dispersa en el suelo, agua y aire, pudiendo entrar en la cadena alimentaria, ya sea por el propio método de aplicación o por las reacciones que sufre en el medio (lixiviación, escorrentía, degradación química o biológica) (Arias et al., 2008). Esto influye en el alcance espacio-temporal del daño ambiental que provocan los pesticidas y, en concreto, el HCH. A pesar de haberse prohibido su uso a finales del siglo XX en la mayor parte del mundo, se han encontrado y se siguen encontrando trazas de HCH en suelo (Concha et al., 2006; Łozowicka et al., 2016), aire (Lammel et al., 2007; Li et al., 2006), agua (Fuscoletti et al., 2015; Lammel et al., 2007), productos alimentarios (Blasco et al., 2004; Szpyrka et al., 2015; Witczak y Pohorylo, 2015), animales (Erkmen y Kolankaya, 2006; Malik et al., 2007; Reindl et al., 2013) e incluso en sangre de seres humanos (Bhatnagar et al., 2004) y tejido adiposo (Kutz et al., 1991).

Los isómeros de HCH aplicados en campo pueden permanecer en el suelo hasta 15 años después de su última aplicación y sufrir transformaciones químicas (fotodegradación, hidrólisis y reacciones redox) y transformaciones microbianas (biodegradación) (Phillips et al., 2005). Los procesos de sorción-desorción son los que van a condicionar que el HCH esté disponible o no para estas reacciones y, por consiguiente, qué fracción permanecerá en el suelo y qué fracción podrá moverse más fácilmente y alcanzar a aguas subterráneas y seres vivos. La sorción del HCH a las partículas del suelo depende mayoritariamente del contenido y naturaleza de la materia orgánica del suelo (MOS) y, en caso de que su contenido sea menor de 1%, también de la fracción mineral (Ren et al., 2018). Desde el suelo, también pueden llegar a la vegetación por adsorción radicular y quedar retenidos en distintos órganos de la planta. La vegetación puede ser un importante

sumidero de pesticidas y al morir y descomponerse puede aumentar la acumulación de estos compuestos en el suelo (Rodríguez Garrido, 2009).

El HCH llega a la atmósfera en forma de gas, tras su volatilización, en el propio aerosol tras la aplicación, o adsorbido a la materia particulada, donde puede migrar grandes distancias, depositarse de nuevo y/o degradarse por fotólisis. Debido a la estabilidad de los enlaces C-Cl, sufren una descomposición muy lenta y la mayor parte del HCH queda sometido a procesos de transporte (El-Shahawi et al., 2010). En estas condiciones, pueden recorrer largas distancias siguiendo las corrientes atmosféricas dominantes lo cual implica, debido al efecto de destilación global, un movimiento desde latitudes bajas con temperaturas más cálidas a latitudes altas con temperaturas más bajas, donde son depositados (Walker et al., 1999). Por esta razón existen evidencias de la presencia de HCH en el Ártico, Antártico y océano Pacífico, muy lejos de su lugar de producción o utilización. El transporte y la capacidad de reacción varía según el isómero (Macdonald et al., 2000; Walker et al., 1999). Desde la atmósfera, el HCH puede transferirse al suelo o vegetación por deposición de las partículas (deposición seca) o por la lluvia (deposición húmeda).

El carácter lipofílico de los HCH facilita su entrada en la cadena alimentaria a través de procesos de bioacumulación y biomagnificación. Las principales rutas de exposición a estos compuestos son por contacto, inhalación e ingestión. No se conoce exactamente su mecanismo de actuación, pero su elevada toxicidad está demostrada tanto en vegetales (*e.g.* Calvelo Pereira et al., 2010) como en animales (*e.g.* Mrema et al., 2013). Todos los isómeros son neurotóxicos, hepatotóxicos e inmunotóxicos para animales y seres humanos; además, presentan efectos en el sistema reproductor y efectos taratogénicos en animales (*i.e.* pueden cruzar los tejidos de la placenta animal y provocar defectos congénitos en el feto durante su gestación). También existen evidencias de carcinogenicidad en animales y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés, *US EPA*) clasifica al isómero  $\alpha$ -HCH como carcinógeno B2 (carcinógeno humano probable), el  $\beta$ -HCH como C (carcinógeno humano posible), el  $\delta$ -HCH como carcinógeno D (no clasificado), y el isómero  $\gamma$ -HCH se considera B2/C (existen evidencias que sugieren su carcinogenicidad pero no es suficiente como para establecer el potencial cancerígeno) (Pereira et al., 2008; Willett et al., 1998).

#### **1.4. BIODEGRADACIÓN DE HCH Y SU BIODISPONIBILIDAD COMO FACTOR LIMITANTE**

Los isómeros de HCH pueden ser degradados por microorganismos, pero debido a su baja solubilidad en agua y su fuerte sorción en los suelos, tienen una baja biodisponibilidad que limita el proceso (Willett et al., 1998).

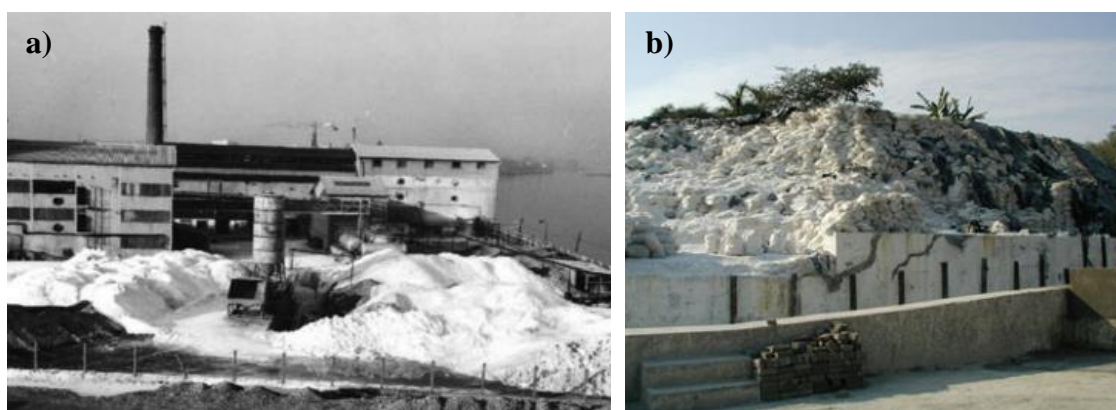
Existe una gran controversia para definir qué es la “biodisponibilidad” de un compuesto. Por esta razón, en ocasiones se evita este término y se utiliza en su lugar “procesos de biodisponibilidad”, que se definen como las interacciones físicas, químicas y biológicas que determinan la exposición de los organismos a los químicos que están asociados a los suelos y sedimentos (Ehlers et al., 2003). Por otro lado, Semple et al. (2004) destaca la diferencia entre “biodisponibilidad” y “bioaccesibilidad” de un compuesto. A grandes rasgos, la fracción biodisponible es la que está disponible para atravesar la membrana celular de un organismo desde el medio en el que habita en un momento determinado y la fracción bioaccesible es aquello que está o puede estar disponible, después de un período de tiempo, para atravesar la membrana celular de un organismo (Semple et al., 2004; Semple et al., 2007). En cualquier caso, se puede decir que los contaminantes que están fuertemente adsorbidos en el suelo tienen baja biodisponibilidad y son recalcitrantes a su degradación. Este efecto se ve agravado por lo que se conoce como “efecto envejecimiento” o “*aging*”. Con el tiempo, las interacciones de la sorción inicial se intensifican observándose un descenso de las fracciones del contaminante fácilmente desorbibles (Alexander, 2000). En el caso de los HCH, la reactividad de los isómeros depende de la conformación espacial de los Cl, siendo  $\beta$ -HCH el más recalcitrante (Mrema et al., 2013; Phillips et al., 2005).

La baja biodisponibilidad del HCH en suelo, sin embargo, puede verse mejorada mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, los microorganismos poseen una serie de adaptaciones (*e.g.* biosurfactantes) para aumentar esta biodisponibilidad y consecuentemente, su biodegradación (Ren et al., 2018; Semple et al., 2007). Además, numerosas técnicas de remediación de suelos se basan en este mismo principio, utilizando enmiendas para aumentar la movilidad, solubilidad aparente y, por lo tanto, la biodisponibilidad de los contaminantes y su posterior degradación. En este contexto, la remediación mejorada por compuestos de carácter surfactante, o, por sus siglas en inglés, *SER - Surfactant-Enhanced Remediation* - es una de las técnicas más prometedoras.

## 1.5. CONTAMINACIÓN POR HCH: DESCRIPCIÓN DE LA PROBLEMÁTICA AMBIENTAL ACTUAL

A día de hoy se estima una producción global de casi 10.000 kt de HCH-técnico y 600 kt de lindano entre los años 1950-2000 (Vijgen, 2006). En ambos casos hubo varios picos de intensidad de producción, correspondientes a la prohibición de HCH-técnico en los años 70-80 y el consecuente aumento del uso de lindano en las distintas regiones. El uso en Europa alcanzó el 63% del global y España fue el sexto país en el *ranking* europeo (Vijgen, 2006).

Durante el proceso de fabricación de Lindano se generan residuos de otros isómeros de HCH no deseados en la siguiente proporción: 1 t de lindano – 8 a 12 t de otros isómeros HCH. Esto quiere decir que la producción estimada de 600.000 t de lindano ha generado de 4,8 a 7,2 millones de t de residuos de HCH (Vijgen, 2006; Vijgen et al., 2011). Estos residuos se abandonaban en muchas ocasiones a cielo abierto o en vertederos incontrolados, sin reparar en el grave impacto medioambiental que podría suponer, así como en el gran riesgo para la salud humana (ver Fig. 2).



**Fig. 2 a)** Desechos de HCH en una fábrica de Francia (1972). El polvo llevado por el viento llegó a Alemania y Suiza, donde se observó contaminación de la leche materna y de vaca por HCH, llegándose a prohibir a las madres que amamantaran a sus hijos (Vijgen et al., 2019) **b)** Montaña de HCH en una fábrica de lindano de la India (Vijgen et al., 2013).

El uso indiscriminado de HCH/lindano y la mala gestión de los residuos generados en su producción, junto con su elevada persistencia, toxicidad y bioacumulación, han ocasionado importantes episodios de contaminación en todo el mundo (consultar: <http://www.ihpa.info/actions/2010/02/10/hch-map/>). Por consiguiente, este problema ha ganado mayor visibilidad e interés entre los científicos, gobiernos y empresas responsables en las últimas décadas; en concreto la Asociación Internacional de HCH y

Pesticidas (o por sus siglas en inglés IHPA - *International HCH & Pesticides Association*-) ha realizado numerosos estudios y grandes labores para promover la cooperación internacional y el intercambio de conocimientos que permitan abordar los desafíos del manejo y la remediación de suelos contaminados por HCH (consultar: [www.ihpa.info](http://www.ihpa.info)). Actualmente, el uso del HCH/lindano está prohibido en 52 países y se han formalizado diversas iniciativas globales para mitigar y/o eliminar la contaminación generada por estos compuestos (*e.g.* el Convenio OSPAR, el Protocolo de Aarhus o el Convenio de Róterdam) (Vijgen et al., 2011). No obstante, la falta de acción y compromiso político a nivel nacional y la desinformación sobre la localización y tamaño de los focos de contaminación, impiden avanzar hacia una solución global real. Vijgen et al. (2019) insiste en que se desconoce la magnitud real del problema y defiende la necesidad de un mayor compromiso de las partes, una mayor cooperación y colaboración internacional y una mayor inversión en investigación para buscar tecnologías sostenibles de eliminación de HCH/lindano, si pudiera ser, acordes a la economía circular para recuperar el HCl comercializable.

#### **1.6. TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HCH (BIORREMEDIACIÓN)**

Hasta ahora, pocos países han llevado a cabo acciones reales de gestión y descontaminación de suelos con residuos de HCH. Estas acciones, además, se basan en labores de contención (encapsulamiento) y no de “destrucción o transformación irreversible” como sugiere el Convenio de Estocolmo. El encapsulamiento no es sostenible, ni desde un punto de vista medioambiental por el riesgo de contaminación por filtraciones a aguas subterráneas o suelos anexos, ni económico por su elevado coste de construcción, seguimiento y mantenimiento. Es una solución ineficaz que deja el problema para futuras generaciones (Morillo y Villaverde, 2017; Vijgen et al., 2011, 2019; Weber et al., 2013).

Existen numerosas estrategias de tratamiento de suelos contaminados, algunas de aplicación habitual y otras todavía en fase experimental. Se pueden utilizar métodos de contención, separación o eliminación de contaminantes, que a su vez pueden ser físicos, químicos o biológicos (Morillo y Villaverde, 2017). Además, según la forma en la que se apliquen se distinguen entre tratamientos *in situ*, si los contaminantes se tratan en el foco de contaminación o *ex situ*, si se excava el suelo para su posterior tratamiento, ya sea en

el mismo lugar (*on site*) o en instalaciones externas que requieren el transporte del suelo contaminado (*off site*). La elección de una u otra estrategia de descontaminación dependerá de cada situación y de los objetivos que se quieran alcanzar. Algunos factores que se deben tener en cuenta en esta decisión son: las características del lugar, el tipo de contaminación (puntual o difusa), la concentración y la naturaleza del contaminante, el uso final del suelo y ciertos factores socioeconómicos (Lombi y Hamon, 2004; Morillo y Villaverde, 2017). Los proyectos de remediación de HCH, y cualquier proyecto de remediación de suelos en general, requieren una planificación previa y minuciosa ya que una mala decisión podría conducir al desastre, como ocurrió, por ejemplo, en Brasil (Braga et al., 2002).

Se ha constatado la efectividad de diversas tecnologías de eliminación de HCH en campo, aunque la mayoría de ejemplos que existen son de técnicas de remediación físico-química: la Decloración Catalizada por Bases (BCD, *Base Catalysed Dechlorination*) en Barakaldo (País Vasco); la desorción térmica, en Francia; la extracción con disolventes, en los Países Bajos o la ISCO (*In situ Chemical Oxidation*) en Sabiñánigo (Huesca) (Vega et al., 2016; Vijgen et al., 2019). Estas tecnologías son muy costosas que no pueden ser una opción para los países empobrecidos en la actualidad ni para todos en general en el futuro (Vijgen et al., 2013). La remediación biológica o biorremediación es una opción más económica, respetuosa con el medio ambiente, tiene mayor aceptación social y es más sencilla de aplicar que la química (la mayoría de técnicas de biorremediación se pueden realizar *in situ* y las químicas, no) (Morillo y Villaverde, 2017).

La biorremediación puede llevarse a cabo principalmente mediante degradación con microorganismos o de fitorremediación (Lombi y Hamon, 2004; Morillo y Villaverde, 2017). Los estudios sobre fitorremediación de HCH son pocos y la mayoría se centran en rizorremediación (*e.g.* Abhilash et al., 2013). Además, a pesar de tener ventajas, plantea dos problemas: 1. La elevada dependencia de las condiciones climáticas, concentración de contaminante y tolerancia de la planta; y 2. El destino de los residuos vegetales. (Lombi y Hamon, 2004; Morillo y Villaverde, 2017). La remediación microbiana es una técnica respetuosa con el medio ambiente y con alto potencial para su aplicación en campo (Lal et al., 2010). Puede llevarse a cabo *in situ* (atenuación natural) y estimular el crecimiento bacteriano propio del suelo añadiendo O<sub>2</sub>, enmiendas, o nutrientes inorgánicos (bioestimulación) y/o introduciendo bacterias que tengan las capacidades específicas de degradación del contaminante (bioaumento) (Lombi y Hamon, 2004); o puede realizarse

*ex situ* en biorreactores, principalmente en forma de lodos (*bioslurry*) o en biopilas (*e.g.* Quintero et al., 2006).

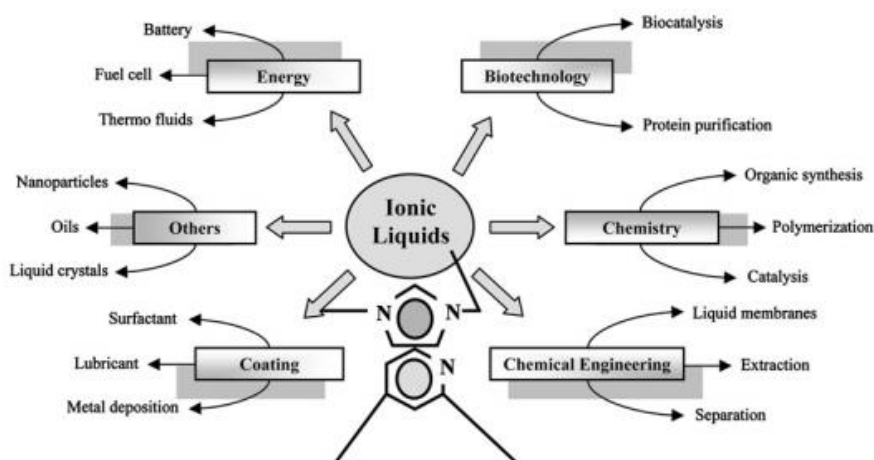
El mayor desafío de la biorremediación es la baja disponibilidad del HCH. Para aumentar esta biodisponibilidad se pueden utilizar surfactantes (naturales- biosurfactantes- o artificiales) en lo que se conoce como remediación mejorada por surfactantes, o, por sus siglas en inglés, *SER - Surfactant-Enhanced Remediation* -. El aumento de la biodisponibilidad no debe ser menor a la ratio de degradación del HCH, ya que si lo es puede constituir un problema de toxicidad para la población microbiana o de contaminación de aguas subterráneas.

### **1.7. LÍQUIDOS IÓNICOS: APLICACIÓN POTENCIAL EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS**

Los líquidos iónicos (LIs) son sales formadas por un catión y un anión que generalmente están en estado líquido a temperatura ambiente. A diferencia de las sales tradicionales, el catión y el anión son de tamaño y simetría diferentes, de tal forma que las fuerzas atractivas catión-anión son bajas y su empaquetamiento poco eficaz. Esto hace que tengan puntos de fusión menores de 100°C y que sus rangos en estado líquido sean muy amplios. Aunque el primer líquido iónico descrito en la bibliografía (nitrato de etilamonio) fue sintetizado en 1914, no es hasta finales del siglo XX cuando su utilización e investigación despegan crecientemente. Su baja volatilidad e inflamabilidad y sus excelentes propiedades de solvatación, son algunas de las características que despertaron el interés por los LIs (Amde et al., 2015; Castillo Borja, 2015; Jastorff et al., 2003; Ranke et al., 2007).

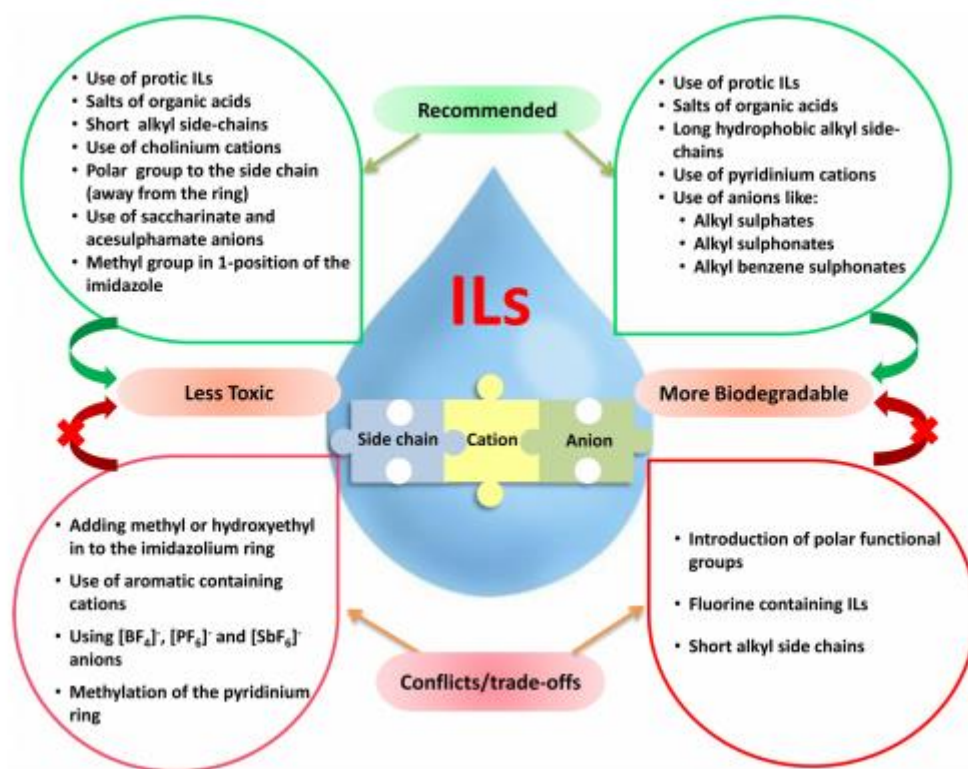
Los LIs más utilizados están constituidos por un catión de tipo imidazolio, piridinio, pirrolidinio, amonio cuaternario o fosfonio cuaternario; y un anión que puede ser un halógeno (Cl, Br), hexafluorofosfato (PF<sub>6</sub>), tetrafluoroborato (BF<sub>4</sub>), alquilsulfato (R-SO<sub>4</sub><sup>-</sup>), alquilsulfonato (R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o un acetato (-CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Sin embargo, se estima que existen 10<sup>18</sup> combinaciones catión-anión posibles (Cvjetko Bubalo et al., 2014). Cualquier cambio en la estructura de los LIs provoca un cambio en sus propiedades físico-químicas. Esto resulta en una gran variedad de compuestos con un amplio rango de aplicaciones (ver Fig. 3) y garantiza la posibilidad de poder variar las propiedades físico-químicas para diseñar un LI óptimo para un propósito de aplicación concreto. Por eso

muchas veces se refieren a los LIs como líquidos iónicos de tarea específica (en inglés, *Task-Specific Ionic Liquids* o *TSILs*) (Figueira González, 2017; Ranke et al., 2007).



**Fig. 3** Esquema obtenido de Thuy Pham et al. (2010) que resume la amplia variedad de aplicaciones conocidas en la actualidad de los líquidos iónicos (LIs)

Debido principalmente a su baja volatilidad y baja inflamabilidad fueron considerados un avance en la “química verde”. No obstante, estas mismas características pueden suponer un problema para su degradación y persistencia en el medio ambiente (Ranke et al., 2007). Por esta razón, numerosos autores han evaluado su comportamiento en el medio, su biodegradabilidad y su toxicidad (*e.g.* Amde et al., 2015; Cvjetko Bubalo et al., 2014; Ranke et al., 2007; Thuy Pham et al., 2010). Los estudios se centran sobre todo en LIs con el catión de tipo imidazolil y la mayoría concuerdan en que una mayor longitud de la cadena alquílica unida al catión aumenta su toxicidad y que los grupos éteres o polares en las cadenas laterales, la disminuyen. También afirman que los aniones  $[\text{BF}_6]$  y  $[\text{PF}_4]$  pueden liberar HF por hidrólisis y, por lo tanto, ser más tóxicos, o que añadir aniones de tipo sulfato, sulfonato o benceno sulfonato los hace más biodegradables. En la Fig. 4 se resumen algunas de las conclusiones obtenidas en estas investigaciones. Además, para poder caracterizar un LI como sostenible es necesario tener en cuenta el ciclo de vida completo del compuesto (Castillo Borja, 2015) y el proceso técnico en el que será aplicado (Ranke et al., 2007).



**Fig. 4** Esquema obtenido de Amde et al. (2015) donde se recogen varias claves para la síntesis de líquidos iónicos (en inglés, *Ionic Liquids* o *ILs*) menos tóxicos y más biodegradables.

### 1.7.1. LÍQUIDOS IÓNICOS CON ACTIVIDAD SURFACTANTE (*SURFACE-ACTIVE IONIC LIQUIDS* O *SAILS*)

Algunos LIs son sustancias anfóteras (*i.e.* tienen una región hidrófoba o polar y una región hidrófila o apolar) con propiedades tensoactivas como las de los surfactantes. Esto significa que pueden tener la capacidad de reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles de forma significativa y un poder de agregación en disolución similar a la de los surfactantes convencionales (Łuczak et al., 2008). Estos LIs reciben el nombre de *Surface-Active Ionic Liquids* o *SAILS* (Cornellas et al., 2011).

En medios acuosos y a bajas concentraciones los surfactantes se encuentran en forma de monómeros, pero por encima de una concentración específica (denominada concentración micelar crítica o CMC) tienden a formar agregados. La forma de estos agregados depende de la geometría de los surfactantes, pero la más común es la micela (ver Fig. 6) (Łuczak et al., 2008). Las micelas son estructuras dinámicas que se forman y disocian continuamente en tiempos muy pequeños (milisegundos) y que se encuentran en equilibrio dinámico con los monómeros libres. Cuando se forman estas micelas, las

propiedades físicas de los surfactantes, *e.g.* la conductividad eléctrica, cambian significativamente (Figueira González, 2017).

De forma similar a los surfactantes convencionales, se han desarrollado varios tipos de *SAILs* catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos o cataniónicos (Srinivasa Rao et al., 2014) y se ha investigado su capacidad de agregación en medios acuosos (*e.g.* Cheng et al., 2014; Cornellas et al., 2011). La tipología del surfactante o *SAIL* depende de la carga iónica del grupo polar (*i.e.* catiónicos, si la carga es catiónica; aniónicos, si es aniónica; y no iónicos, si no tienen carga; ver Fig. 5).

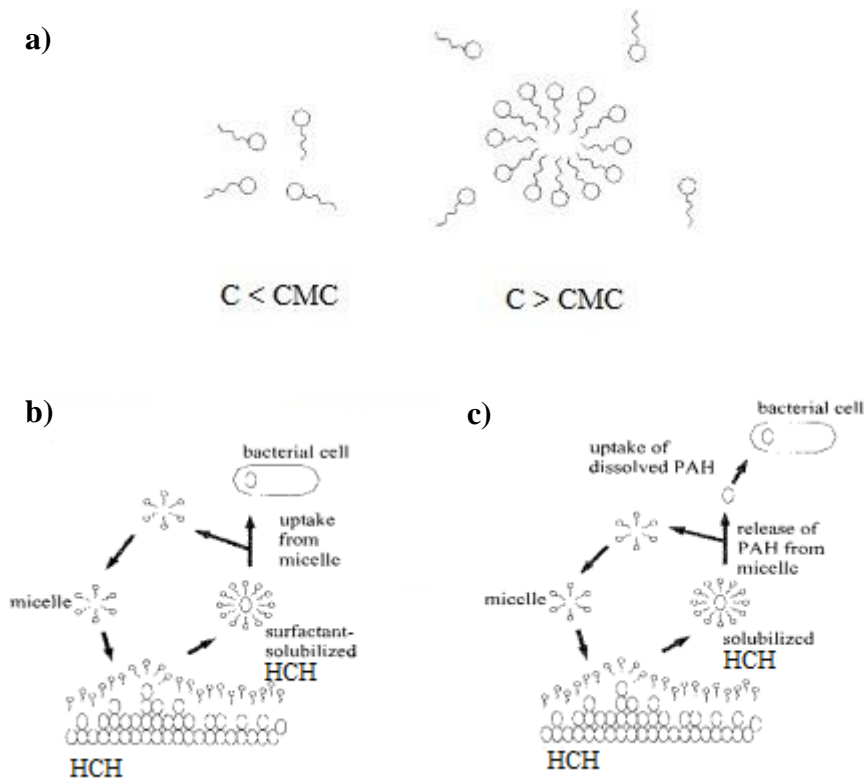


**Fig. 5** Clasificación de los surfactantes según la carga iónica del grupo hidrófilo o grupo de cabeza. Imagen obtenida de González et al. (2010).

La mayoría de datos de la bibliografía son de los *SAILs* de la familia alquilimidazolio con halógenos como anión ( $[C_n\text{mim}][X]$ ), que se comportan como surfactantes catiónicos. Sin embargo, estos *SAILs* tienen una tendencia a la micelización mucho mayor que los surfactantes catiónicos convencionales por los fuertes enlaces de hidrógeno entre el contraión y el hidrógeno del C2 relativamente ácido del anillo de imidazolio (Cornellas et al., 2011; Matsubara et al., 2010). No obstante, la diferencia más importante de los *SAILs* respecto a los surfactantes convencionales es su versatilidad estructural (Galvano y El Seoud, 2010).

Hasta ahora, se han estudiado los *SAILs* principalmente en la recuperación mejorada de petróleo (Rodríguez et al., 2017; Sakthivel et al., 2017), pero su actividad surfactante demuestra potencialidad para su utilización en biorremediación de suelos como agentes movilizadores de contaminantes orgánicos hidrofóbicos como el HCH (*SER*). De esta forma, podrían aumentar la solubilidad aparente del HCH facilitando el contacto entre contaminante y microorganismo degradador y, por tanto, aumentando su biodisponibilidad para su degradación.

Los factores que se deben tener en cuenta en la selección de surfactantes para biorremediación, y que también aplicarían para la selección de *SAILs* son: efectividad, coste, aceptación pública y regulatoria, biodegradabilidad, toxicidad y adsorción (Mulligan et al., 2001; Paria, 2008). Generalmente los más utilizados son los surfactantes no iónicos porque tienen una mayor biodegradabilidad, menor toxicidad y menor CMC; los catiónicos resultan tóxicos para el suelo.



**Fig. 6** Micelas formadas por sustancias anfóteras, surfactantes o *Surface-Active Ionic Liquids (SAILs)* (a); los grupos de cabeza, situados hacia el exterior en contacto con la fase polar (agua) se corresponden con la parte polar de los surfactantes o *SAILs*, mientras que la parte interior la forman las colas apolares (hidrofóbicas). A bajas concentraciones están en forma de monómeros libres y al alcanzar una concentración tal que su solubilidad se ve limitada, se “autoasocian” formando agregaciones que pueden tener la forma de estas micelas. Estas micelas pueden atrapar los contaminantes orgánicos hidrofóbicos y hacerlos más accesibles para los microorganismos degradadores, que pueden utilizarlos directamente del interior de la micela (b) o una vez liberados a la fase acuosa (c). Esquema adaptado de Makkar, R.S., Rockne (2003)

## CAPÍTULO II: MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. SURFACE-ACTIVE IONIC LIQUIDS (SAILS)

En este estudio se utilizaron 15 *SAILS*, 8 surfactantes y dos mezclas de un *SAIL* catiónico (IoLiLyte C1EG) y un surfactante aniónico (dodecilbenceno sulfonato o DBS) (ver Tabla 2). De acuerdo con la definición de líquidos iónicos expuesta previamente, se consideraron *SAILS* aquellos que tienen un punto de fusión menor de 100°C (*i.e.* NaAOT, NaONS y SDS, serán tratados como surfactantes; ver Tabla 2). Brij C10, Brij L4, Igepal Co-520, Tetrakis y TX-100 son surfactantes no iónicos típicos. La selección de *SAILS*/surfactantes se realizó a partir de la revisión bibliográfica previa a la experimentación en base a tres criterios: toxicidad, biodegradabilidad y coste. En la Tabla 2 se muestran detalladamente las diferentes propiedades físico-químicas de los *SAILS*/surfactantes (CMC, peso molecular, densidad, y balance lipofílico-hidrofílico o HLB).

Los *SAILS*/surfactantes de este trabajo fueron obtenidos mayoritariamente en Sigma e IoLiTec. Los que aparecen sin CAS *Registry* no. en la Tabla 2 fueron sintetizados por el grupo de investigación EQUIFASE del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

**Tabla 2** Propiedades físico-químicas y estructuras de los *SAILs* (*Surface-Active Ionic Liquids*) y surfactantes seleccionados para los experimentos del presente trabajo.

PM: Peso molecular; PF: Punto de fusión; CMC: Concentración Micelar Crítica; HLB: Balance hidrófilo-lipófilo; ND: No disponible.

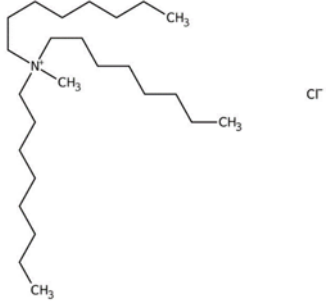
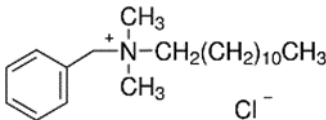
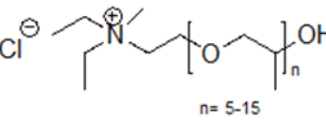
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)         | CAS Registry No. | Estructura química  | PM<br>(g mol <sup>-1</sup> ) | Densidad<br>(g cm <sup>-3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm) | HLB |
|--|------------------|---|------------------------------|-----------------------------------|------------|--------------|-----|
| <b>1. CATIONICOS</b>                               |                  |   |                              |                                   |            |              |     |
| Cloruro de triocetil metilamonio<br>(Aliquat 336)  | 63393-96-4       |    | 404,164                      | 0,88                              | -20        | 808,320      | ND  |
| Cloruro de bencildimetil dodecilamonio<br>(Benzyl) | 139-07-1         |   | 339,99                       | ND                                | ND         | 2991,912     | ND  |
| IoLiLyte 221PG                                     | 68132-96-7       |  | ND                           | 1,042                             | ND         | 899,800      | ND  |

Tabla 2 (cont.)

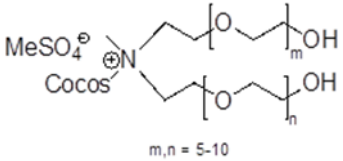
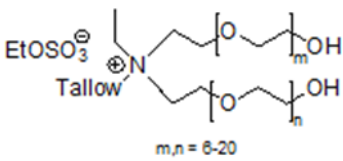
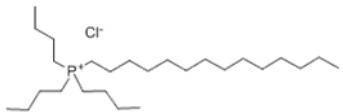
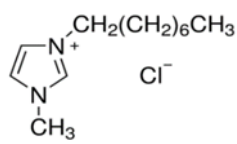
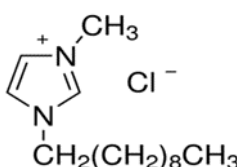
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)                         | CAS <i>Registry</i> No. | Estructura química  | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm) | HLB |
|--|-------------------------|---|---------------|----------------------------------|------------|--------------|-----|
| <b>1. CATIONICOS</b>   |                         |   |               |                                  |            |              |     |
| <b>IoLiLyte C1EG</b>   | 68989-03-7              |     | ND            | ND                               | ND         | ND           | ND  |
| <b>IoLiLyte T2EG</b>   | 68071-95-4              |     | ND            | ND                               | ND         | ND           | ND  |
| Cloruro de<br>tributil tetradecilfosfonio<br><b>(CYPHOS 4345W)</b> | 81741-28-8              |     | 435,00        | 0,956                            | 45         | 435,000      | ND  |
| Cloruro de<br>1-metil-3-octilimidazolio<br><b>([C8mim][Cl])</b>    | 64697-40-1              |   | 230,78        | 1,01                             | 12         | 438,482      | ND  |
| Cloruro de<br>1-decil-3-metilimidazolio<br><b>([C10mim][Cl])</b>   | 171058-18-7             |  | 258,83        | 0,99                             | 38,02      | 14805,08     | ND  |

Tabla 2 (cont.)

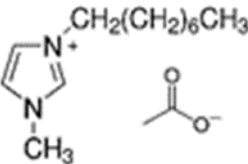
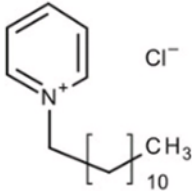
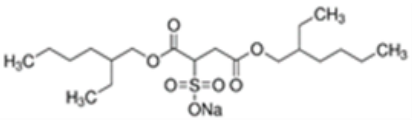
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)                                     | CAS<br><i>Registry</i><br>No. | Estructura química   | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C)  | CMC<br>(ppm) | HLB |
|--|-------------------------------|--|---------------|----------------------------------|-------------|--------------|-----|
| <b>1. CATIONICOS</b>   |                               |  |               |                                  |             |              |     |
| Acetato de<br>1-metil-3-octilimidazolio<br>([C8mim][Ac])                       | ND                            |    | ND            | ND                               | ND          | ND           | ND  |
| Cloruro de<br>1-dodecilpiridinio<br>([C12Py][Cl])                              | 104-74-5                      |   | 283,88        | 1,04                             | 87-89       | 4334,848     | ND  |
| <b>2. ANIÓNICOS</b>  |                               |  |               |                                  |             |              |     |
| Sal sódica de 1,4-bis(2-etilhexoxi)-<br>1,4-dioxobutano-2-sulfonato<br>(NaAOT) | 577-11-7                      |  | 444,56        | 1,1                              | 173-<br>179 | 1182,530     | ND  |

Tabla 2 (cont.)

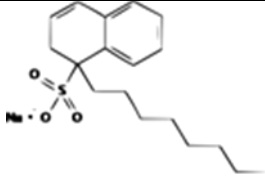
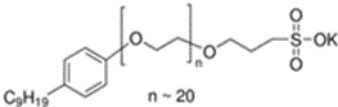
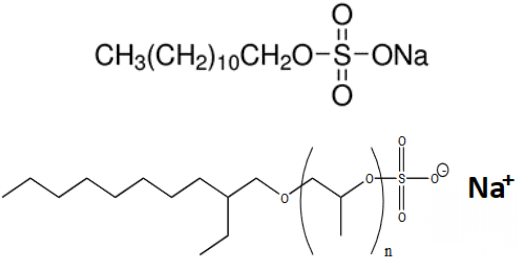
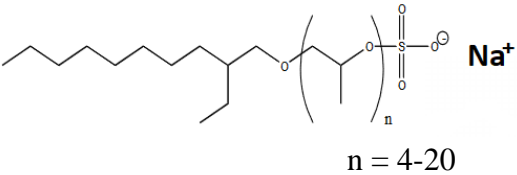
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)                                  | CAS<br><i>Registry</i><br>No. | Estructura química   | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm)     | HLB |
|---|-------------------------------|--|---------------|----------------------------------|------------|------------------|-----|
| <b>2. ANIÓNICOS</b>   |                               |  |               |                                  |            |                  |     |
| Sal sódica de 1-octil-2H-naftaleno-1-sulfonato<br>(NaONS)                   | ND                            |    | 344,4         | ND                               | >300       | ND               | ND  |
| Sal potásica de polietilenglicol-4-nonilfenil-3-sulfopropil-éter<br>(PolyK) | 119438-10-7                   |    | 1260          | 1                                | ND         | ND               | ND  |
| Dodecil sulfato de sodio<br>(SDS)   | 151-21-3                      | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{ONa}$<br> | 288,38        | ND                               | 204-207    | 2018,66 – 2883,8 | 40  |
| Na Alfoterra  | ND                            |    | Ca. 555       | 1,05                             | 37         | ND               | ND  |

Tabla 2 (cont.)

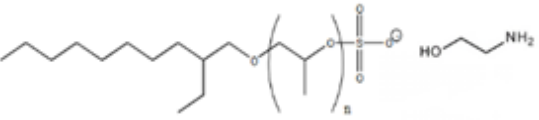
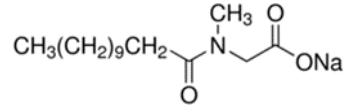
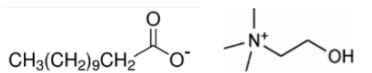
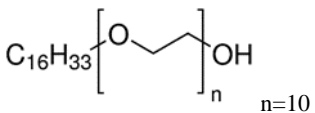
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)    | CAS<br><i>Registry</i><br>No. | Estructura química   | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm) | HLB |
|---|-------------------------------|--|---------------|----------------------------------|------------|--------------|-----|
| C <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> OH Alfoterra   | ND                            |    | Ca. 555       | 1,05                             | -20        | ND           | ND  |
| Sal sódica de laurilsarcosina<br>(Lauryl)     | 137-16-6                      |    | 293.38        | ND                               | 45-47      | 3725,926     | ND  |
| Dodecanoato de colina<br>(ChC12)              | ND                            |    | ND            | ND                               | ND         | ND           | ND  |
| <b>3. NO IÓNICOS</b>                          |                               |  |               |                                  |            |              |     |
| Polietilenglicol hexadecil éter<br>(Brij C10) | 9004-95-9                     |  | 683,00        | 0,977                            | 32-34      | 1,366        | 12  |
| Polietilenglicol dodecil éter<br>(Brij L4)    | 9002-92-0                     | C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> OH  | ND            | 0,95                             | ND         | ND           | 9   |

Tabla 2 (cont.)

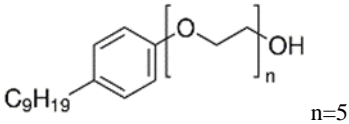
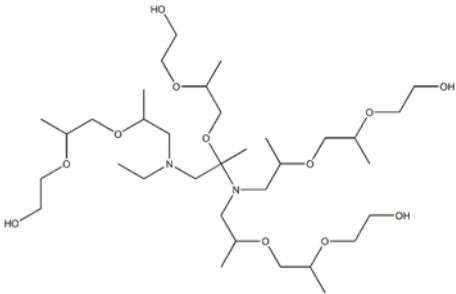
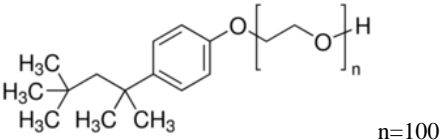
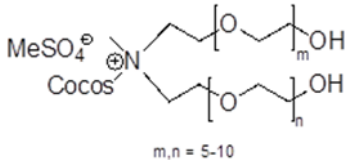
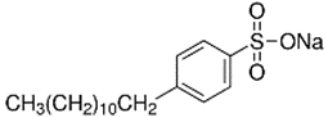
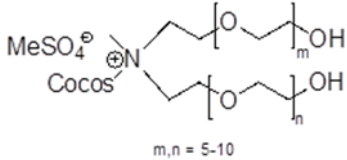
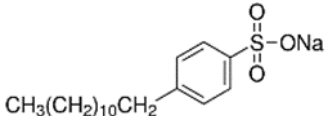
| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto)                                    | CAS Registry<br>No. | Estructura química   | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm)   | HLB  |
|---|---------------------|--|---------------|----------------------------------|------------|----------------|------|
| Polioxietilen-5-nonilfenil éter<br>(Igepal CO-520)                            | 68412-54-4          |   | 441,00        | 0,997                            | ND         | ND             | 10   |
| Etilendiamina tetrakis (etoxilado-block- propoxilado)<br>tetrol<br>(Tetrakis) | 26316-40-5          |   | 700,94168     | 1,05                             | 21         | ND             | 1-7  |
| Polietilenglicol<br>octilfenil éter<br>(TX-100)                               | 9002-93-1           |  | 625           | 1,064                            | 6          | 137,5-<br>-150 | 13,5 |

Tabla 2 (cont.)

| <i>SAIL</i> /Surfactante<br>(Nombre corto) | CAS Registry No. | Estructura química   | PM<br>(g/mol) | Densidad<br>(g/cm <sup>3</sup> ) | PF<br>(°C) | CMC<br>(ppm) | HLB |
|--|------------------|--|---------------|----------------------------------|------------|--------------|-----|
| <b>4. MEZCLA: SAIL Y SURFACTANTE</b>       |                  |  |               |                                  |            |              |     |
| Blend 1                                    | ND               | 55,31% IoLiLyte C1EG:<br><br>$m, n = 5-10$  | ND            | ND                               | ND         | ND           | ND  |
|  |                  | 44,69% DBS:<br>                             |               |                                  |            |              |     |
| Blend 2                                    | ND               | 26,32% IoLiLyte C1EG:<br><br>$m, n = 5-10$ | ND            | ND                               | ND         | ND           | ND  |
|  |                  | 73,68% DBS:<br>                           |               |                                  |            |              |     |

Para la realización de los experimentos del presente trabajo, se prepararon disoluciones de *SAILS*/surfactantes en agua destilada a dos concentraciones:  $5 \text{ g L}^{-1}$  y  $15 \text{ g L}^{-1}$ . Se utilizó la misma concentración en todos los *SAILS*/surfactantes a pesar de tener CMCs muy variadas para mantener la misma proporción con el contaminante (HCH) en todos los casos. Estas concentraciones fueron escogidas con el objetivo de trabajar siempre por encima de las CMCs conocidas de los *SAILS*/surfactantes utilizados en el experimento (ver Tabla 2). Así pues, la mayor concentración es igual a la mayor CMC conocida de los *SAILS*/surfactantes utilizados, es decir, la de [C10mim][Cl] (CMC =  $14,8 \text{ g L}^{-1}$ ; ver Tabla 2) y la menor se utilizó para reducir la relación entre la concentración del *SAIL*/surfactante y la CMC de los compuestos con CMCs más pequeñas. Además, se realizó un ensayo adicional con Brij C10 por tener la CMC más baja (CMC =  $1,366 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizando una tercera concentración más pequeña ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Previamente a la experimentación, se midió el pH y la conductividad eléctrica (C.E.) de las disoluciones de *SAILS*/surfactantes para comprobar su potencial toxicidad en el suelo y su posible influencia en la germinación y crecimiento temprano de las especies vegetales del ensayo de ecotoxicidad.

## 2.2. ENSAYOS *BATCH* DE MODIFICACIÓN DE SOLUBILIDAD DE HCH EN DISOLUCIÓN

Para el estudio del efecto de los *SAILS*/surfactantes sobre la solubilidad de los isómeros de HCH, se utilizaron  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH sólidos cristalinos (Dr. Ehrenstorfer) de pureza 98.0, 97.5, 98.6 y 98.6, respectivamente.

Se prepararon disoluciones *stock* de cada isómero de HCH en acetona (PESTANAL, Fluka) a concentración  $5 \text{ g L}^{-1}$  que fueron utilizadas en el resto de la experimentación. Se pipeteó una alícuota de  $50 \mu\text{L}$  de la disolución *stock* de  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH y otra de  $2 \mu\text{L}$  de la disolución de  $\beta$ -HCH en  $5 \text{ mL}$  de disolución de *SAIL*/surfactante ( $n=3$ , para cada concentración de *SAIL*/surfactante) en tubos de centrífuga de pyrex con tapón de rosca y septum de PTFE, de forma que en la mezcla *SAIL*/surfactante con HCH, los isómeros tuvieran una concentración *ca.* 10 veces por encima del límite de solubilidad en agua de cada isómero (*i.e.* para  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH la concentración final fue  $50 \text{ mg L}^{-1}$  y para  $\beta$ -HCH,  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ; ver Tabla 1). La mezcla de *SAIL*/surfactante con los isómeros de HCH se dejó en agitación durante 24 h y se centrifugó (Hettich<sup>TM</sup> Zentrifugen EBA 21; 3000 rpm, 10

min) para separar el HCH no disuelto. Los controles se prepararon con agua destilada (sin *SAIL*/surfactante) de la misma forma (n=3).

La extracción del HCH disuelto en la fase líquida se realizó mediante extracción asistida por ultrasonidos, con tasas de recuperación superiores al 95% para todos los isómeros (datos no mostrados). De acuerdo con esto, 4 mL del sobrenadante se extrajeron con 4 mL de hexano (1:1, v/v) en tubos de ensayo de pyrex con tapón de rosca y se dejaron en el baño de agua ultrasónico (Ultrasons, J. P. Selecta, S. A.) durante 20 minutos. Para preparar los extractos a analizar, se separó la fase orgánica y se eliminaron los restos de agua con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Los extractos se almacenaron a -4 °C hasta su análisis.

### 2.2.1. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS DE HCH MEDIANTE GC/MS

Todos los extractos de HCH fueron analizados para su cuantificación en un cromatógrafo de gases (Modelo 450 GC, *Agilent Technologies*) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo 220 MS, *Agilent Technologies*) (GC/MS).

Para el análisis por GC/MS, se utilizaron patrones de calibración de cada isómero en hexano, de acuerdo a la concentración del extracto, preparados a partir de una solución madre de 5 g L<sup>-1</sup> (1-5000 µg L<sup>-1</sup>). Se añadió un estándar interno tanto a los extractos como a los patrones (250 µg L<sup>-1</sup>). El estándar interno consistía en una mezcla de compuestos deuterados: 1,4-diclorobenceno-d<sub>4</sub>, acenaftaleno-d<sub>10</sub>, criseno-d<sub>12</sub>, naftaleno-d<sub>8</sub>, perileno-d<sub>12</sub> y fenantreno-d<sub>10</sub> (*Internal Standards Mix 33*, Dr. Ehrenstorfer); el fenantreno-d<sub>10</sub> fue el compuesto escogido como estándar interno por su similitud en el tiempo de retención con los isómeros de HCH.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Trace Gold 5SILMS* (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; *Thermo Scientific*) bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de 80 °C (mantenida durante 1.5 min), aumentada en 30 °C min<sup>-1</sup> hasta 180 °C (mantenida durante 1 min), después en 3 °C min<sup>-1</sup> hasta 200 °C y después en 40 °C min<sup>-1</sup> hasta 290 °C (mantenida durante 0.25 min); helio como gas portador (flujo constante de 1 mLmin<sup>-1</sup>); temperatura de funcionamiento del inyector 280 °C; las muestras (1 µL) se inyectaron en modo *split/splitless* y el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo tándem. Las moléculas se ionizaron por impacto de electrones y la temperatura de la trampa de iones se ajustó a 220 °C.

### 2.3. ECOTOXICIDAD DE LOS *SAILs* Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO)

De acuerdo con la lista de especies históricamente utilizadas en pruebas de toxicidad en plantas de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) 208 (OECD, 2006) se seleccionaron dos especies para el estudio: una monocotiledónea, *Lolium Perenne* (raigrás), y una dicotiledónea, *Trifolium pratense* (trébol rojo).

Para el experimento, se realizaron 4 réplicas de 5 semillas de cada especie colocadas en placas Petri con tres papeles de filtro impregnados de 8 mL de *SAIL*/surfactante (a 15 g L<sup>-1</sup>) o agua destilada (control). Las semillas fueron esterilizadas previamente con hipoclorito sódico 2,5% en agitación (20 min) con el fin de evitar el crecimiento fúngico. Las placas se sellaron con Parafilm y se dejaron germinar en una cámara de crecimiento en oscuridad a 22°C durante una semana.

Se estudiaron dos parámetros: germinación y crecimiento temprano. Las semillas con una raíz de más de 1 mm se consideraron germinadas y en los casos de germinación positiva, se midió el crecimiento del tallo en *Trifolium pratense* y de tallo y raíz en *Lolium perenne* utilizando una regla graduada.

### 2.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los valores obtenidos de la extracción de HCH y su cuantificación por GC/MS fueron normalizados frente al control para determinar la capacidad de solubilización de los *SAILs* y surfactantes (*i.e.* S/C). Para comprobar si existían diferencias en el efecto de los distintos *SAILs* y surfactantes sobre la solubilidad de los isómeros de HCH se aplicó un ANOVA de un factor (*post hoc* de Bonferroni) empleando el software *IBM SPSS Statistics 25.0*. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los isómeros alfa y gamma y beta y delta para determinar si existe una influencia de la posición axial o ecuatorial de los átomos de Cl y su susceptibilidad a la solubilización. Se consideró un nivel de significación  $p < 0,05$  para todos los tratamientos estadísticos.

Los resultados de ecotoxicidad de los *SAILs*/surfactantes se expresaron como el número de semillas germinadas frente al total, en porcentaje, y como la medida de longitud (cm) del tallo y raíz de las especies vegetales.

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

### 3.1. MEDICIÓN DE PH Y C.E. DE LOS *SAILs* Y SURFACTANTES

Previamente al experimento se midió el pH y la C.E. de las disoluciones de *SAILs* y surfactantes (a 5 y 15 g L<sup>-1</sup>) para estudiar la posible influencia en los resultados de solubilidad y/o toxicidad. Los valores de pH de las disoluciones de *SAILs*/surfactantes medidos en el laboratorio a temperatura ambiente variaron entre 3,79 - 8,95 cuando C<sub>S</sub> = 5 g L<sup>-1</sup> y entre 3,5 - 9,24 cuando C<sub>S</sub> = 15 g L<sup>-1</sup>. La C.E. varió entre 12,8 y 2160 μS cm<sup>-1</sup> cuando C<sub>S</sub> = 5 g L<sup>-1</sup> y entre 25,6 – 5980 μS cm<sup>-1</sup> cuando C<sub>S</sub> = 15 g L<sup>-1</sup>. Los surfactantes no iónicos presentaron valores de C.E. en torno a 0, mientras que los catiónicos y aniónicos presentaron valores más altos (ver Tabla 3).

**Tabla 3** pH y conductividad eléctrica (C.E.; en μS cm<sup>-1</sup>) de las disoluciones de *Surface-Active Ionic Liquids* (*SAILs*) y surfactantes utilizados en disolución a dos concentraciones 5 g L<sup>-1</sup> y 15 g L<sup>-1</sup>. La C.E. no se pudo medir en NaONS para C<sub>S</sub> = 15 g L<sup>-1</sup>.

| <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES | C.E.                      |                            | pH                        |                            |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                             | (μS/cm)                   |                            | 5 g L <sup>-1</sup>       | 15 g L <sup>-1</sup>       |
| <b>1. CATIONICOS</b>        | <b>5 g L<sup>-1</sup></b> | <b>15 g L<sup>-1</sup></b> | <b>5 g L<sup>-1</sup></b> | <b>15 g L<sup>-1</sup></b> |
| Aliquat 336                 | 218                       | 342                        | 4,28                      | 4,05                       |
| Benzyl                      | 930                       | 2050                       | 6,5                       | 6,65                       |
| IoLiLyte 221PG              | 895                       | 2280                       | 3,79                      | 3,8                        |
| C1EG                        | 411                       | 965                        | 6,57                      | 6,62                       |
| T2EG                        | 185,8                     | 461                        | 6,23                      | 5,85                       |
| CYPHOS 4345W                | 510                       | 1271                       | 5,64                      | 5,32                       |
| C8mim Cl                    | 2160                      | 5980                       | 4,76                      | 4,37                       |
| C10mim Cl                   | 1795                      | 4530                       | 4,2                       | 4,03                       |
| C8mim Ac                    | 1089                      | 3030                       | 6,62                      | 6,58                       |
| C12Py Cl                    | 1404                      | 2550                       | 5,32                      | 6,41                       |
| <b>2. ANIÓNICOS</b>         |                           |                            |                           |                            |
| Na AOT                      | 692                       | 1398                       | 5,41                      | 5,84                       |
| Na ONS                      | 963                       | -                          | 7,32                      | 9,6                        |
| SDS                         | 780                       | 1389                       | 7,25                      | 7,22                       |
| Poly K                      | 363                       | 1036                       | 5,01                      | 4,32                       |
| Na Alfot.                   | 390                       | 1094                       | 6,56                      | 6,58                       |

Tabla 3 (cont.)

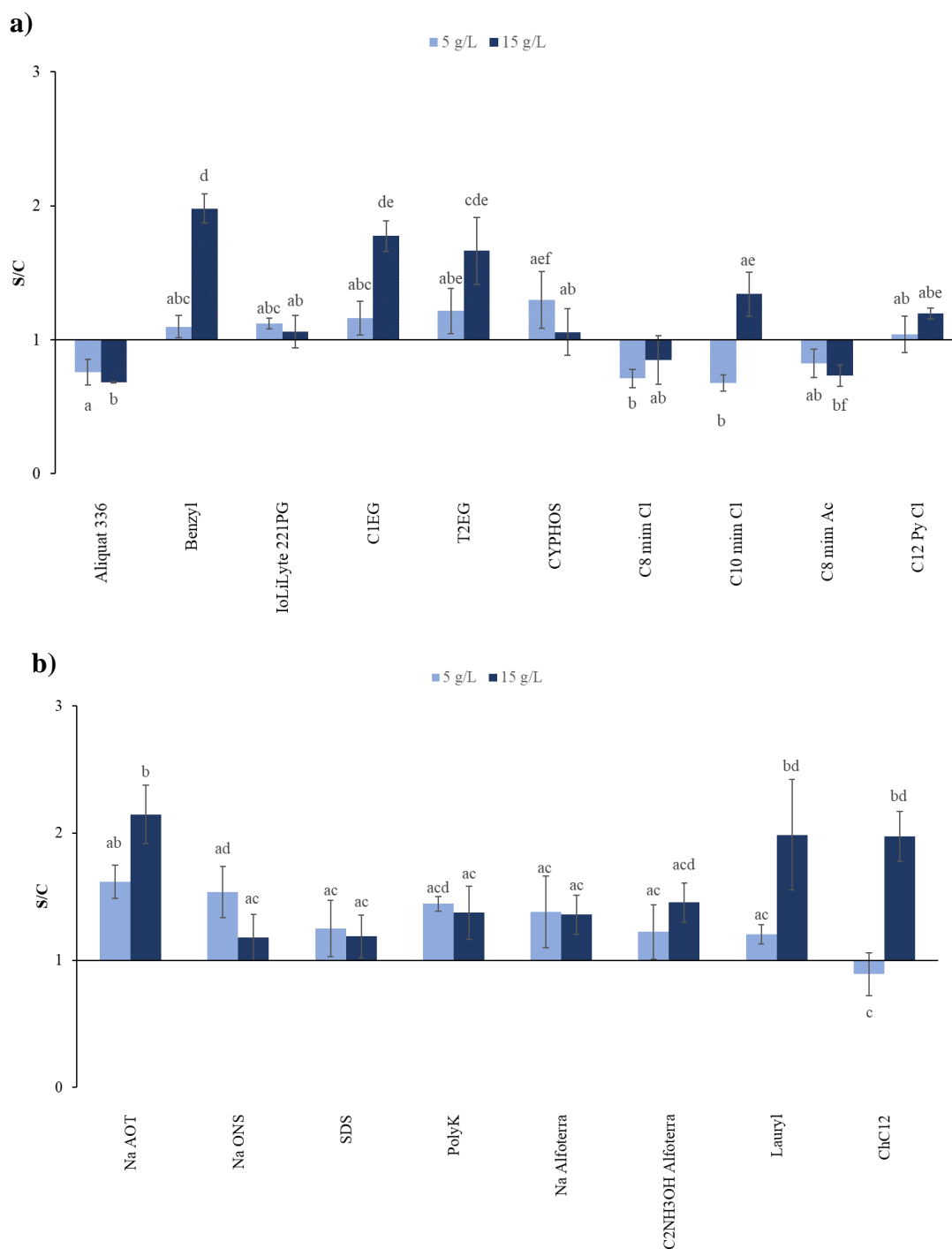
| <i>SAILs</i> Y SURFACTANTES                  | C.E.<br>( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) |                      | pH                  |                      |
|--|-------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
|  | 5 g L <sup>-1</sup>                 | 15 g L <sup>-1</sup> | 5 g L <sup>-1</sup> | 15 g L <sup>-1</sup> |
| <b>2. ANIÓNICOS</b>                          |                                     |                      |                     |                      |
| C2NH3OH Alfot.                               | 469                                 | 1318                 | 6,52                | 7,01                 |
| Lauryl                                       | 534                                 | 2090                 | 7,29                | 8,05                 |
| Ch C12                                       | 764                                 | 1792                 | 8,95                | 9,24                 |
| <b>3. NO IÓNICOS</b>                         |                                     |                      |                     |                      |
| Brij L4                                      | 16,28                               | 43,3                 | 6,1                 | 4,6                  |
| Igepal                                       | 12,8                                | 25,6                 | 5,74                | 5,05                 |
| Tetrakis                                     | 20                                  | 42,3                 | 8,17                | 7,94                 |
| TX-100                                       | 15,4                                | 60,4                 | 4,75                | 3,5                  |
| <b>4. MEZCLAS: <i>SAIL</i> Y SURFACTANTE</b> |                                     |                      |                     |                      |
| Blend1                                       | 822                                 | 2090                 | 7,1                 | 7,21                 |
| Blend2                                       | 1091                                | 2630                 | 7,2                 | 7,49                 |

### 3.2. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD EN AGUA DE LOS ISÓMEROS DE HCH EN PRESENCIA DE *SAILs* Y SURFACTANTES

Las solubilidades experimentales de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH obtenidas en el control (C) en agua destilada, sin *SAIL*/surfactante, en el que se había añadido una concentración de los isómeros diez veces por encima de su límite de solubilidad fueron (media $\pm$ desviación típica):  $\alpha$ -HCH:  $4,42 \pm 1,73$  mg L<sup>-1</sup>;  $\beta$ -HCH:  $1,32 \pm 0,17$  mg L<sup>-1</sup>;  $\gamma$ -HCH:  $8,76 \pm 1,72$  mg L<sup>-1</sup> y  $\delta$ -HCH:  $13,32 \pm 1,57$  mg L<sup>-1</sup>. El orden de magnitud de las solubilidades ( $\delta > \gamma > \alpha > \beta$ ) es el mismo que se observa en la bibliografía y los valores obtenidos están dentro del rango de valores determinados por otros autores (Mackay et al., 2006; Rodríguez Garrido, 2009).

La capacidad de solubilización de HCH de los *SAILs*/surfactantes se estimó utilizando los datos obtenidos de los ensayos *batch* y el análisis por GC/MS, normalizados frente al control. De esta forma, si  $S/C < 1$ , se considera que la solubilidad aparente del HCH disminuye en presencia del *SAIL*/surfactante, mientras que si  $S/C > 1$ , se considera que la solubilidad del HCH aumenta. En la Fig. 7 se muestra la modificación de la solubilidad

respecto al control del conjunto de isómeros de HCH y en las Fig. 8, 9 y 10, la modificación de la solubilidad respecto al control de cada isómero de HCH por separado.



**Fig. 7** Capacidad de solubilización del conjunto de isómeros de HCH de los *SAILs*/surfactantes catiónicos (a), aniónicos (b) y no iónicos (c). La capacidad de solubilización se representa como los datos de solubilidad del isómero obtenidos en presencia del *SAIL*/surfactante normalizados frente a los obtenidos en el control (S/C). Los colores de las barras indican las dos concentraciones ensayadas y las letras, las diferencias significativas existentes entre las dos concentraciones y entre los *SAILs*/surfactantes aplicados.

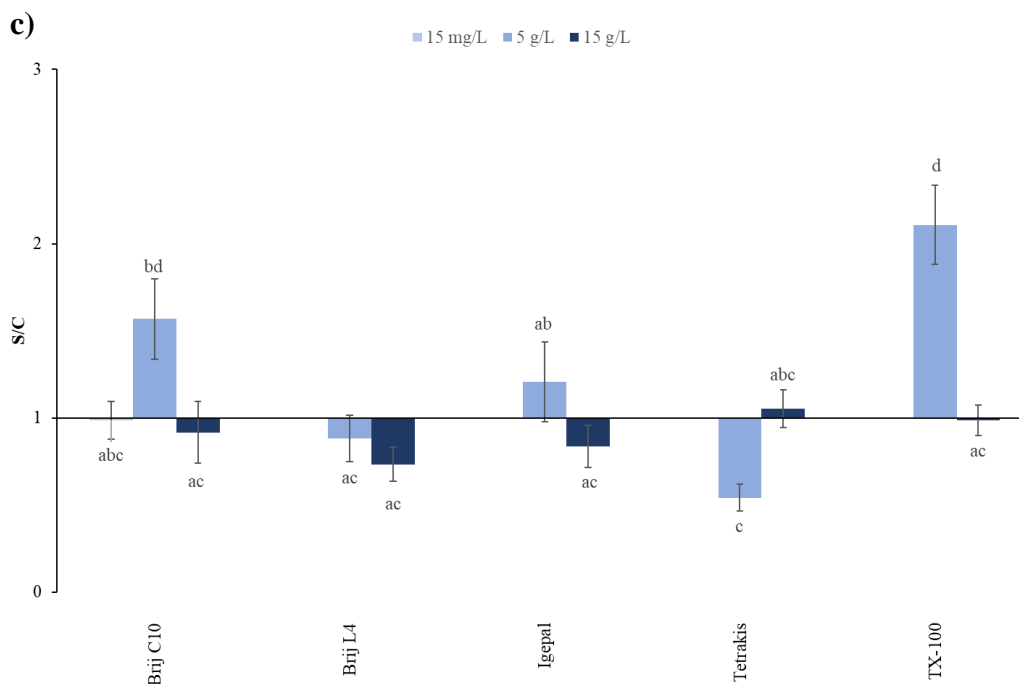


Fig. 7 (cont.)

### 3.2.1. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DEL CONJUNTO DE ISÓMEROS DE HCH

La mayoría de los *SAILs*/surfactantes utilizados en este experimento aumentaron la solubilidad del conjunto de isómeros de HCH, en al menos una de las concentraciones ensayadas (ver Fig. 7). Los 8 *SAILs*/surfactantes aniónicos aplicados en el experimento (*i.e.* el 100%) pudieron aumentar la solubilidad del conjunto de isómeros, independientemente de la concentración utilizada, mientras que, en el caso de los catiónicos, sólo lo hicieron 6 de los 10 aplicados (*i.e.* el 70%) y en el caso de los no iónicos, 3 de los 5 aplicados (*i.e.* el 60%). A pesar de esto, en todos los grupos hubo al menos un compuesto que prácticamente duplica el valor del sumatorio de HCH obtenido en el control y que presenta diferencias significativas respecto al resto (de mayor a menor;  $S/C = \text{media} \pm \text{desviación típica}$ ): NaAOT ( $S/C = 2,15 \pm 0,23$ ;  $C_s = 15 \text{ g L}^{-1}$ ); TX-100 ( $S/C = 2,11 \pm 0,23$ ;  $C_s = 5 \text{ g L}^{-1}$ ) y Benzyl ( $S/C = 1,98 \pm 0,11$ ;  $C_s = 15 \text{ g L}^{-1}$ ). Benzyl es un *SAIL* catiónico, NaAOT es un surfactante aniónico y TX-100 es un surfactante no iónico. No obstante, otros compuestos demostraron tener un efecto mínimo o nulo sobre

la solubilidad de HCH: Aliquat 336, [C8mim][Cl] y [C8mim][Ac] (*SAILs* catiónicos) y Brij L4 y Tetrakis (surfactantes no iónicos).

En cada grupo de *SAILs*/surfactantes existen subgrupos definidos por similitudes estructurales (ver Tabla 2), ya sea por la región polar (el catión, en los catiónicos, o el anión, en los aniónicos) o por la región apolar (la cadena alquílica unida a la región polar). No se observó una correspondencia en los resultados de estos subgrupos estructurales con subgrupos que hubiesen facilitado la solubilización del HCH (ver Fig. 7).

Dentro de los catiónicos, Aliquat 336, Benzyl, IoLiLyte 221PG, IoLiLyte C1EG e IoLiLyte T2EG tienen amonio cuaternario como grupo dominante de la región polar y no todos son capaces de solubilizar HCH (Aliquat 336) y si lo hacen, no lo hacen de la misma manera *e.g.* IoLiLyte 221PG obtuvo un valor de S/C (media  $\pm$  desviación típica) igual a  $1,12 \pm 0,04$  ( $C_s = 15 \text{ g L}^{-1}$ ), casi la mitad del obtenido por Benzyl (ver Fig. 7). Otro ejemplo son los *SAILs*/surfactantes con un anillo de imidazolio en la región polar ([C8mim][Cl], [C10mim][Cl] y [C8mim][Ac]): únicamente [C10mim][Cl] puede aumentar la solubilidad de HCH por encima del control. Además, [C8mim][Cl] y [C10mim][Cl] son iguales estructuralmente excepto por la longitud de cadena alquílica que está unida al anillo (8 y 10 carbonos, respectivamente), pero [C10mim][Cl] ( $C_s = 15 \text{ g L}^{-1}$ ) ofrece mejores resultados. [C8mim][Cl] y [C8mim][Ac] son iguales excepto por el anión que neutraliza la carga del anillo de imidazolio ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , respectivamente) y, en este caso, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de solubilización de HCH.

Todos los surfactantes no iónicos, excepto Tetrakis, tienen un grupo polietilenglicol, pero sólo Brij C10 y TX-100 fueron capaces de aumentar la solubilidad de HCH significativamente. Brij C10 y Brij L4, se diferencian en el número de carbonos de la cadena alquílica (36 y 20, respectivamente) y los valores de S/C son:  $>1$  en el de la cadena más larga (Brij C10) y  $<1$  en el de la cadena más corta (Brij L4).

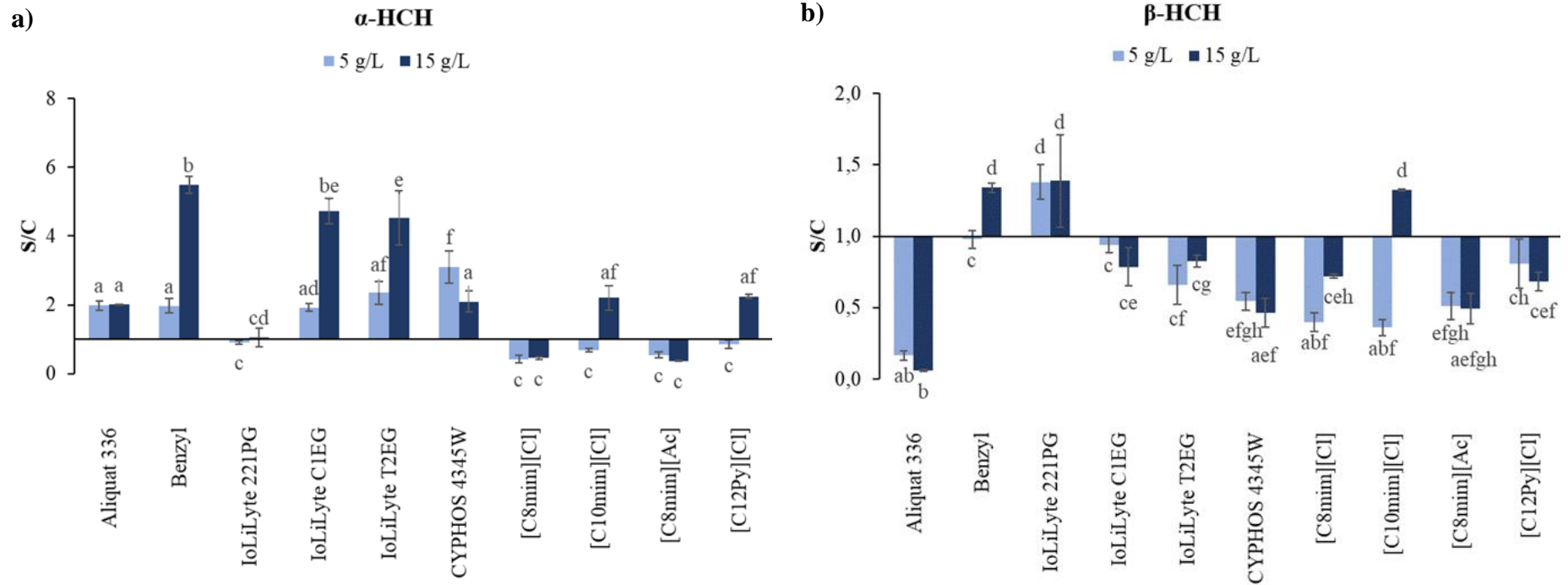
En el caso de los aniónicos, para los que los resultados fueron siempre  $S/C > 1$ , en al menos una de las concentraciones, las diferencias entre subgrupos estructurales no fueron tan claras. Así y todo, se observó una capacidad de solubilización notablemente mayor de NaAOT, Lauryl y ChC12 que consiguieron duplicar la solubilidad del HCH obtenida en el control. ChC12 y Lauryl son *SAILs* derivados del ácido dodecanoico, mientras que

NaAOT es un surfactante derivado de un ácido sulfónico (docusato de sodio o Aerosol-OT).

### 3.2.2. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE CADA ISÓMERO DE HCH

La modificación de la solubilidad por *SAILS*/surfactantes es más o menos pronunciada según el isómero de HCH (ver Fig. 8, 9 y 10). La máxima solubilización de los isómeros obtenida, fue la siguiente: Benzyl ( $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ) aumentó *ca.* 6 veces la solubilidad de  $\alpha$ -HCH obtenida en el control; NaAOT ( $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ) *ca.* 2 veces la de  $\beta$ -HCH; ChC12 ( $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ) *ca.* 2,5 veces la de  $\gamma$ -HCH; y NaAOT ( $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ) *ca.* 1,5 veces la de  $\delta$ -HCH. Los peores resultados se obtuvieron para los isómeros beta y delta que, no sólo tuvieron los valores de S/C más bajos, sino que además no presentaron mejoras de la solubilidad en presencia de la mayoría de los *SAILS*/surfactantes. NaAOT y TX-100 fueron los únicos que consiguieron aumentar significativamente la solubilidad de los cuatro isómeros (ver Fig. 9 y 10). Los demás *SAILS*/surfactantes mostraron un efecto claramente diferenciado sobre la solubilidad de los isómeros, por ejemplo: Benzyl y Brij C10, aumentaron la solubilidad de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HCH; Brij L4 e Igepal CO-520, de  $\alpha$ -HCH; IoLiLyte 221PG, de  $\beta$ -HCH; y el resto de *SAILS*, sólo de los 2 isómeros  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH. Lauryl mostró un cambio de comportamiento respecto a los isómeros según la concentración utilizada (ver Fig. 9). Incluso Aliquat 336, [C8mim][Cl], [C8mim][Ac], Brij L4 y Tetrakis que no consiguieron aumentar la solubilidad del conjunto de isómeros de HCH (o su efecto fue mínimo) presentaron un comportamiento diferente dependiendo del isómero. Aliquat 336 (Fig. 8) y Brij L4 (Fig. 10) aumentaron la solubilidad de alfa y gamma, pero [C8mim][Cl] (Fig. 8) y Tetrakis (Fig. 10) aumentaron la de delta y no la de alfa y gamma como cabría esperar por el comportamiento del resto de *SAILS*/surfactantes. [C8mim][Ac] no consiguió aumentar la solubilidad de ningún isómero.

Debido a la similitud en la conformación espacial de  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH, por un lado, y de  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HCH, por otro, se midió el coeficiente de correlación de Pearson de los valores de solubilidad obtenidos de los isómeros en presencia de los *SAILS*/surfactantes (incluyendo las mezclas Blend 1 y Blend 2) 2 a 2. Los resultados fueron muy significativos ( $p < 0,01$ ) con un coeficiente  $\rho = 0,845$  para  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH y  $\rho = 0,729$  para  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HCH a  $C_S = 5 \text{ g L}^{-1}$  y  $\rho = 0,839$  para  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH y  $\rho = 0,738$  para  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HCH a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$  (ver Fig. 11).



**Fig. 8** Capacidad de solubilización de los *SAILs*/surfactantes catiónicos sobre los cuatro isómeros de HCH:  $\alpha$ -HCH (a),  $\beta$ -HCH (b),  $\gamma$ -HCH (c) y  $\delta$ -HCH (d). La capacidad de solubilización se representa como los datos de solubilidad del isómero obtenidos en presencia del *SAIL*/surfactante normalizados frente a los obtenidos en el control (S/C). Los colores de las barras indican las dos concentraciones ensayadas y las letras, las diferencias significativas existentes entre los *SAILs*/surfactantes aplicados a 5 y 15 g L<sup>-1</sup>.

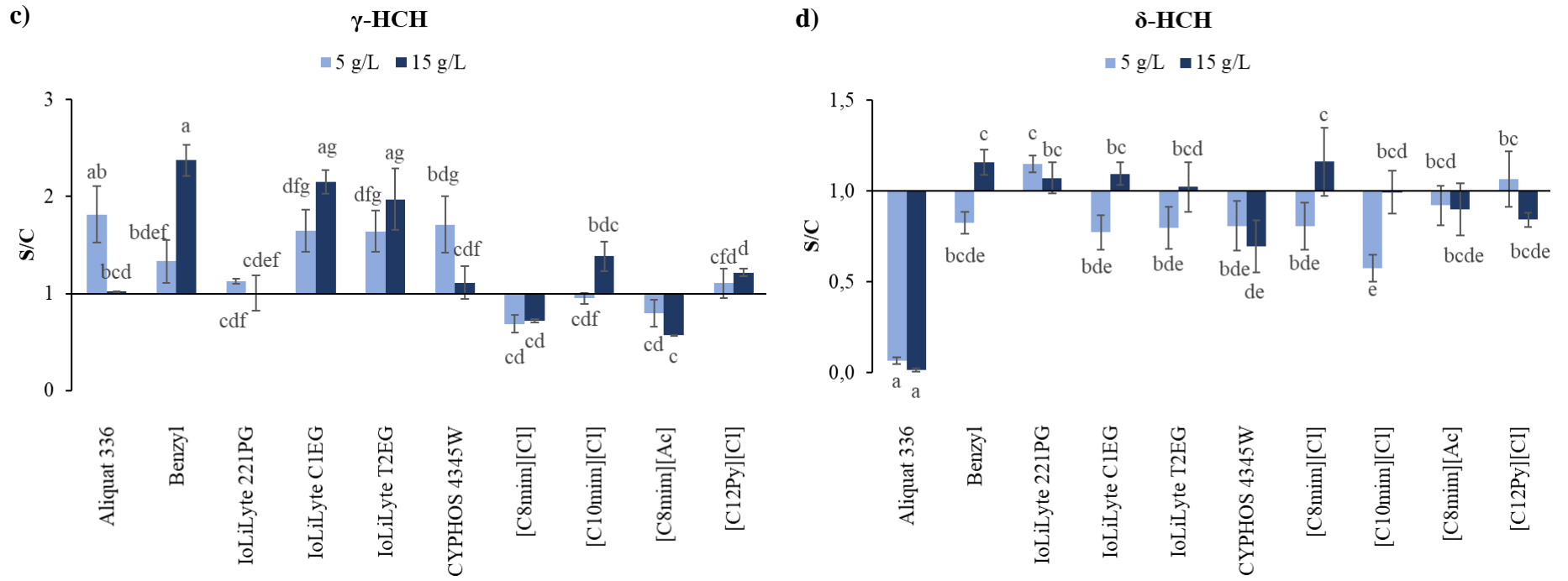
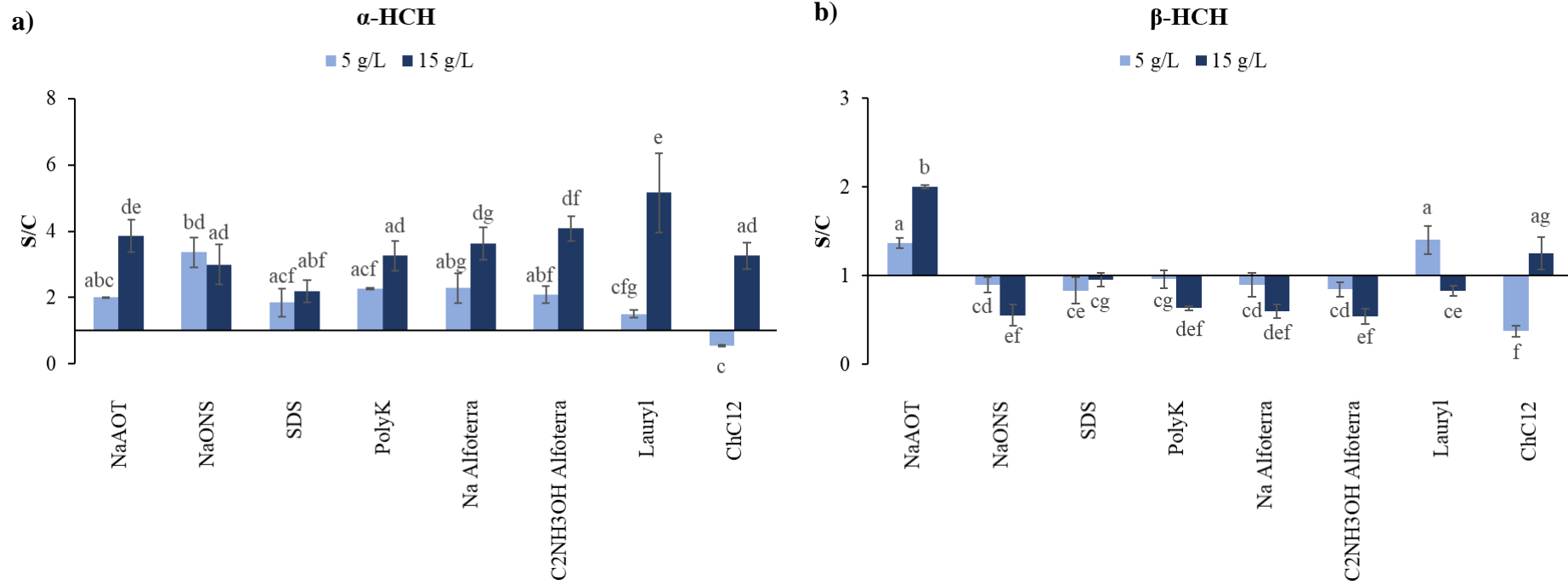


Fig. 8 (cont.)



**Fig. 9** Capacidad de solubilización de los *SAILs*/surfactantes aniónicos sobre los cuatro isómeros de hexaclorociclohexano (HCH):  $\alpha$ -HCH (a),  $\beta$ -HCH (b),  $\gamma$ -HCH (c) y  $\delta$ -HCH (d). La capacidad de solubilización se representa como los datos de solubilidad del isómero obtenidos en presencia del *SAIL*/surfactante normalizados frente a los obtenidos en el control (S/C). Los colores de las barras indican las dos concentraciones ensayadas y las letras, las diferencias significativas existentes entre los *SAILs*/surfactantes aplicados a 5 y 15 g L<sup>-1</sup>.

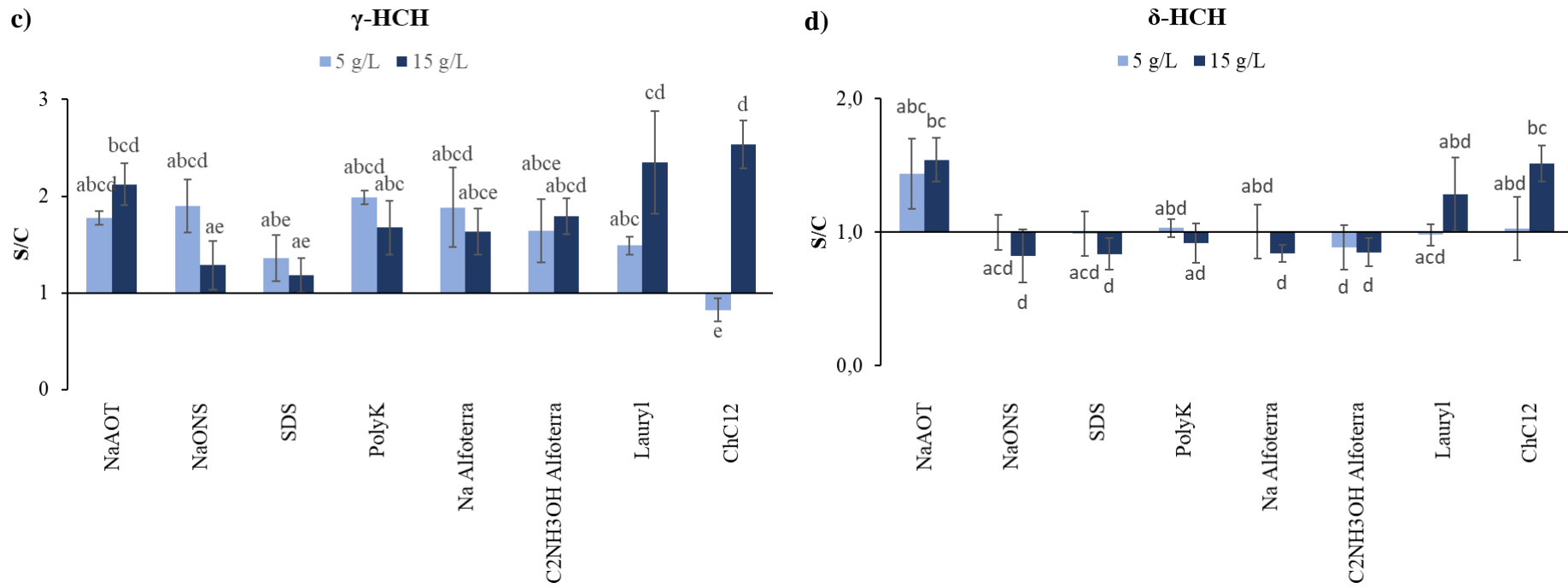
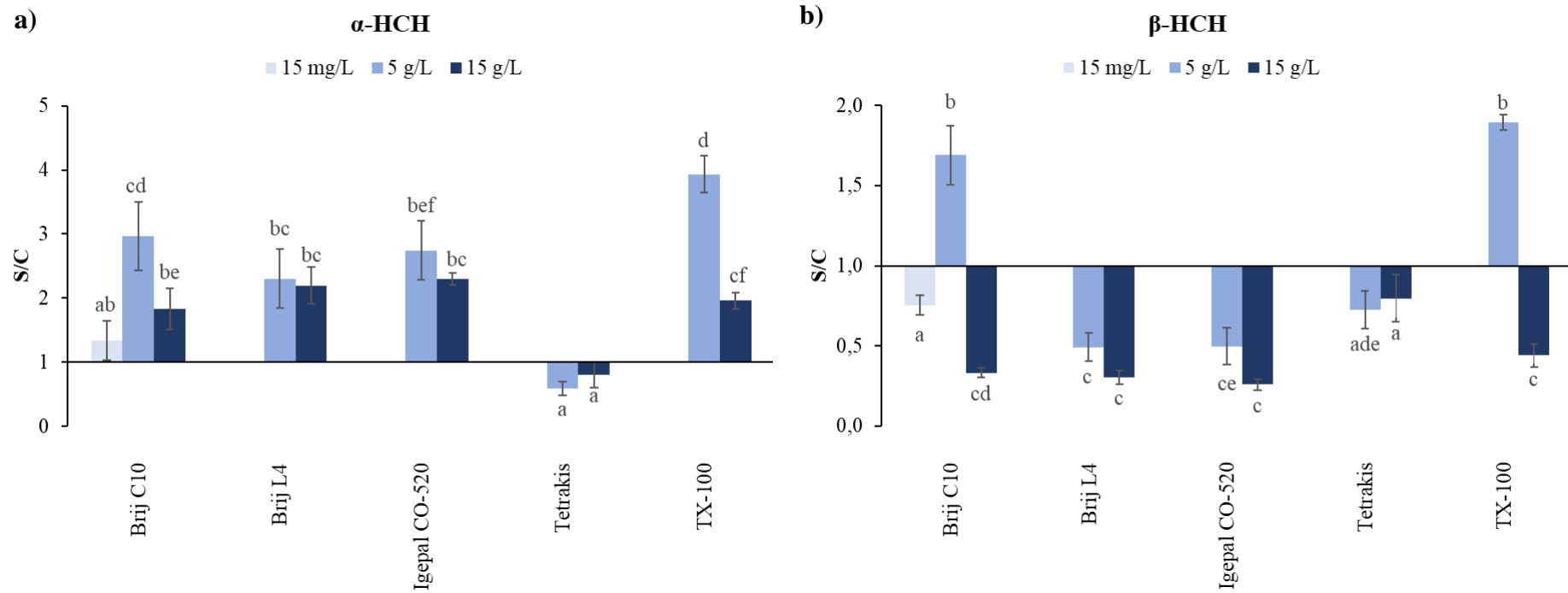


Fig. 9 (cont.)



**Fig. 10** Capacidad de solubilización de los surfactantes no iónicos sobre los cuatro isómeros de hexaclorociclohexano (HCH):  $\alpha$ -HCH (a) y  $\beta$ -HCH (b),  $\gamma$ -HCH (c) y  $\delta$ -HCH (d). La capacidad de solubilización se representa como los datos de solubilidad del isómero obtenidos en presencia del *SAIL*/surfactante normalizados frente a los obtenidos en el control (S/C). Los colores de las barras indican las dos concentraciones ensayadas y las letras, las diferencias significativas existentes entre los *SAIL*s/surfactantes aplicados a 5 y 15 g L<sup>-1</sup> (y 15 mg L<sup>-1</sup> en Brij C10).

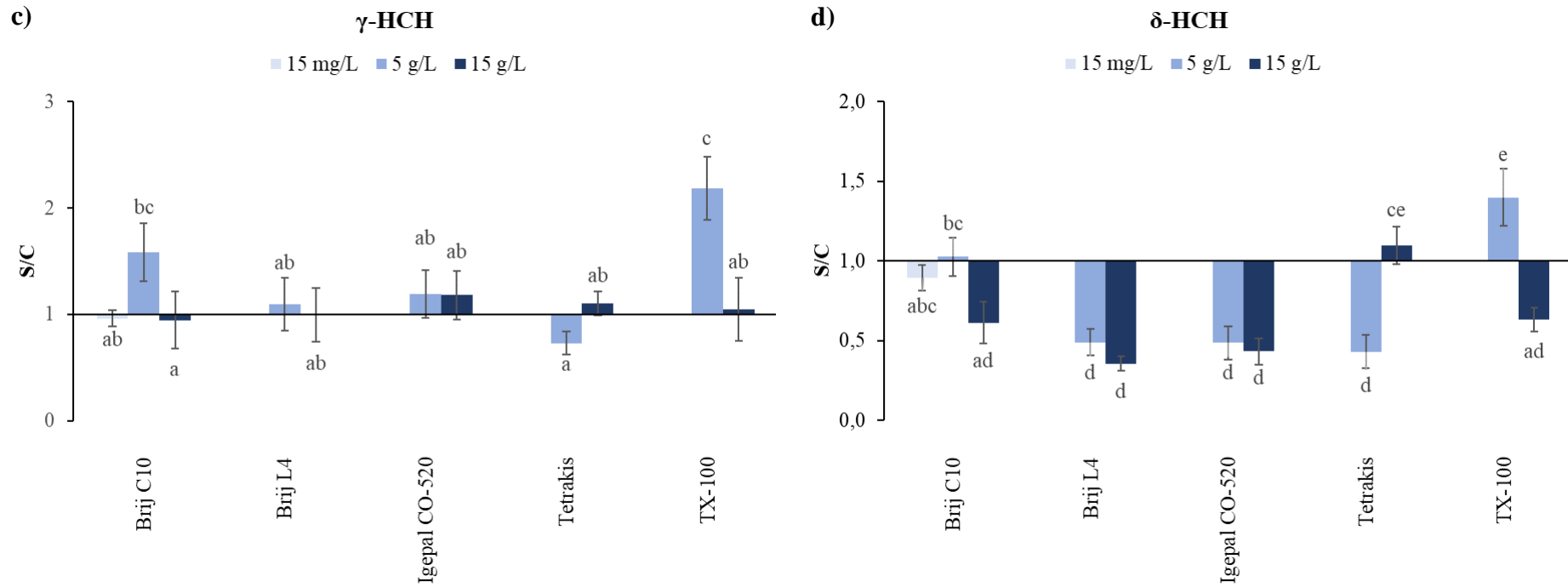
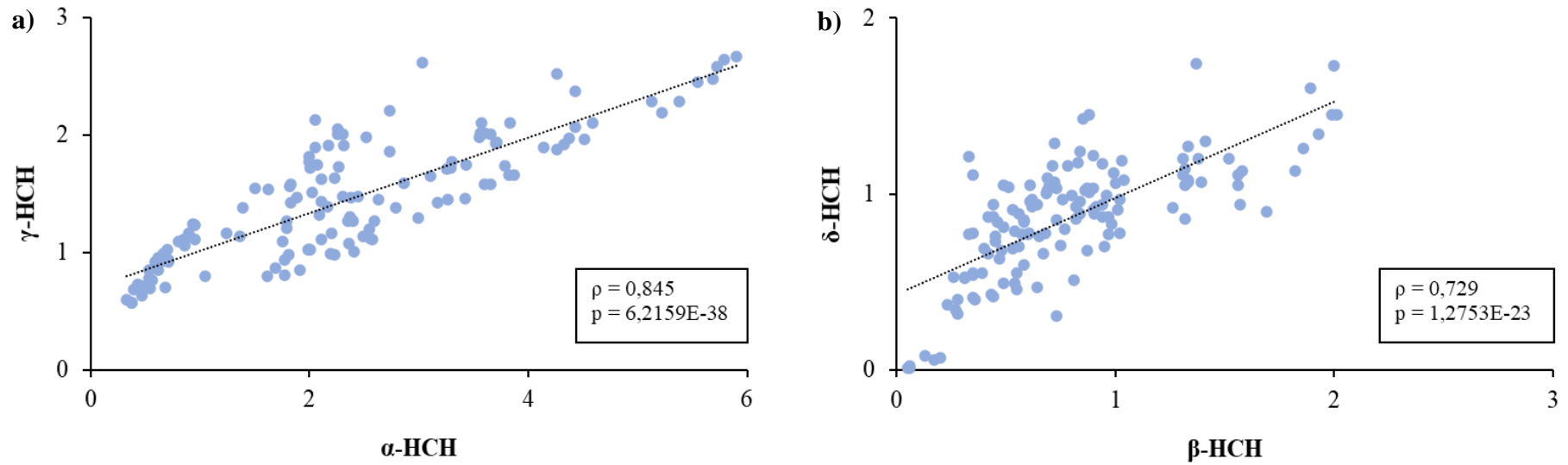


Fig. 10 (cont.)



**Fig. 11** Diagramas de dispersión que muestran el aumento de la solubilidad de  $\gamma$ -HCH respecto a  $\alpha$ -HCH y de  $\delta$ -HCH respecto a  $\beta$ -HCH en presencia de *SAILS*/surfactantes a  $5 \text{ g L}^{-1}$  (a y b) y a  $15 \text{ g L}^{-1}$  (c y d). En las gráficas se incluyen el coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ) y el valor  $p$  ( $p$ ).

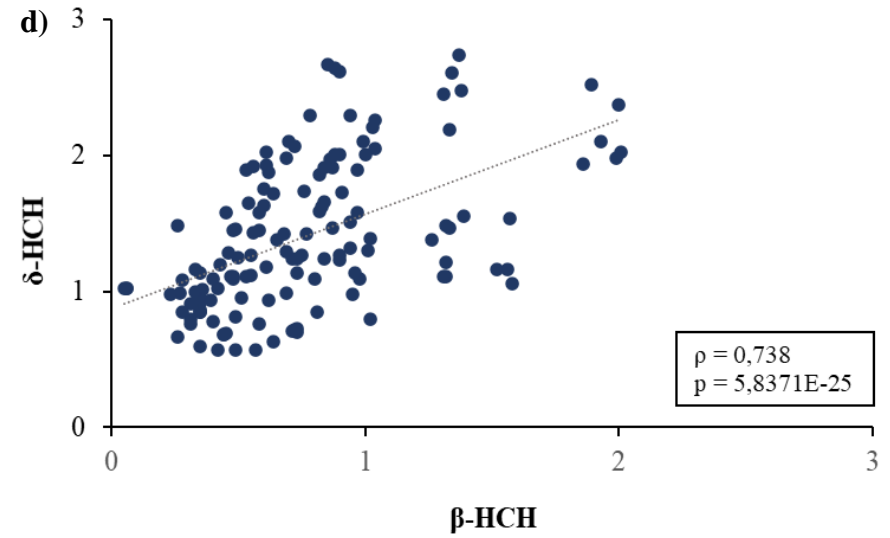
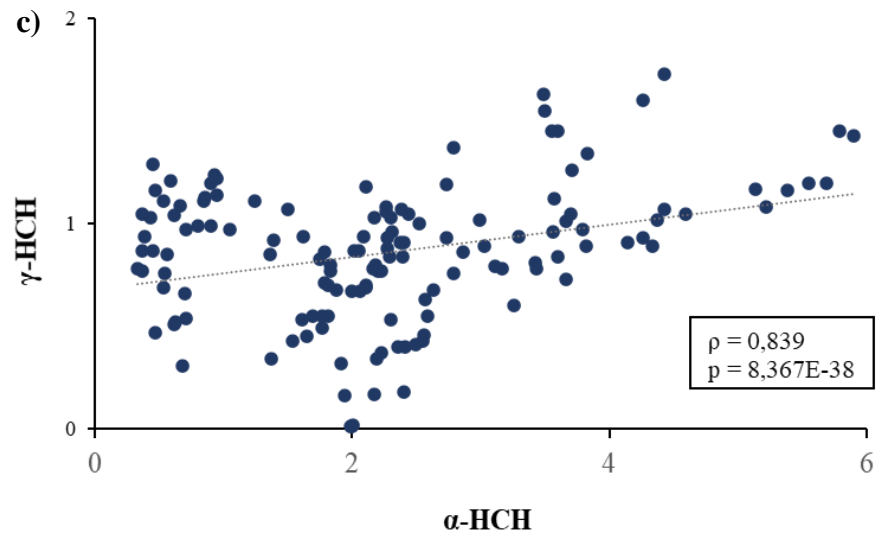


Fig. 11 (cont.)

### 3.2.3. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE HCH SEGÚN LA CONCENTRACIÓN DEL *SAIL*/SURFACTANTE

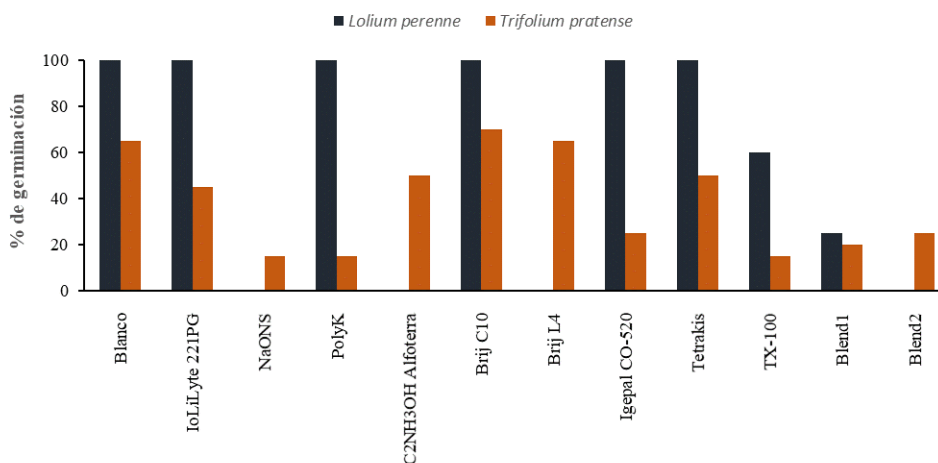
La concentración utilizada tuvo un efecto significativo en la capacidad de solubilización del conjunto de HCH de algunos *SAILS*/surfactantes. Benzyl, IoLiLyte C1EG, IoLiLyte T2EG, [C10mim][Cl], Lauryl y ChC12 (ver Fig. 8 y 9), funcionaron significativamente mejor a 15 g L<sup>-1</sup>, mientras que Brij C10 y TX-100, funcionaron mejor a 5 g L<sup>-1</sup> (ver Fig. 10). La diferencia entre utilizar una concentración y otra es tal que se alcanza un porcentaje de mejora de la solubilización de HCH en TX-100 de *ca.* 114% o de *ca.* 71 % en Brij C10. En el resto de casos, el porcentaje de mejora no fue tan alto, pero sigue siendo relevante llegando a *ca.* 55 % en el caso de ChC12 o a *ca.* 40 - 50 % en Benzyl, C10mim Cl y Lauryl.

Lauryl mostró un comportamiento diferente según el isómero de HCH: consiguió un aumento significativo de la solubilidad de  $\alpha$ -HCH a 15 g L<sup>-1</sup>, de  $\beta$ -HCH a 5 g L<sup>-1</sup> y sin diferencias significativas entre las concentraciones en la solubilización de  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH (ver Fig. 9).

Los demás *SAILS*/surfactantes no tuvieron diferencias significativas en su capacidad de solubilización según la concentración utilizada.

### 3.3. ECOTOXICIDAD DE LOS *SAILS* Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO)

Los resultados del test de ecotoxicidad de *SAILS* sobre germinación y crecimiento temprano para *T. pratense* y *L. perenne* se muestran en la Fig. 12 expresados como porcentaje de germinación y longitud (cm) de tallo, en las dos especies, y raíz, en el caso de *L. perenne*, en la Fig. 13. En las gráficas no se incluyen los *SAILS*/surfactantes que resultaron tóxicos para las dos especies (*i.e.* % germinación = 0) como fueron: Aliquat 336, Benzyl, IoLiLyte C1EG, IoLiLyte T2EG, CYPHOS 4345W, [C8mim][Cl], [C10mim][Cl], [C8mim][Ac], [C12Py][Cl], NaAOT, SDS, NaAlfoterra, Lauryl y ChC12. Algunas semillas de *T. pratense* presentaron signos de toxicidad en NaONS y PolyK (Ver Anexo I).



**Fig. 12** Germinación de *Lolium perenne* (monocotiledónea) y *Trifolium pratense* (dicotiledónea), resultante del ensayo de ecotoxicidad de *Surface-Active Ionic Liquids* o *SAILS* y surfactantes en especies vegetales. Los valores se expresan como porcentaje de semillas germinadas frente al total de semillas.

Como se puede observar en la Fig. 12, *L. perenne* pudo germinar con alta tolerancia a IoLiLyte 221PG, PolyK, Brij C10, Igepal CO-520 y Tetrakis, y relativamente alta a TX-100. *T. pratense* es tolerante a un mayor número de *SAILS*, aunque con un mayor rango de respuesta (de 15 a 70% de germinación). De todos los *SAILS*/surfactantes, el que ofrece mejores resultados es Brij C10 con un 100% de germinación de *L. perenne* y un 70% de germinación de *T. pratense*; no obstante, el crecimiento temprano parece verse inhibido o bien retardado en ambos casos.

El crecimiento temprano en ambas especies se vio afectado: la longitud de la raíz en *L. perenne* fue menor que la del control, aunque el tallo alcanzó en ocasiones un tamaño similar (e.g. en presencia de Poly K). Para *T. pratense*, el crecimiento del tallo fue menor en todos los casos.

Debido a que NaAOT fue uno de los compuestos con mayor capacidad de solubilización para los 4 isómeros y resultó ser tóxico a  $C_s = 15 \text{ g L}^{-1}$  se realizó un ensayo adicional para determinar los límites superior e inferior de toxicidad y elaborar una curva de dosis-respuesta que permitiera determinar la  $EC_{50}$ . La  $EC_{50}$  es un parámetro muy utilizado en los *test* de ecotoxicidad y se define como la concentración efectiva de un compuesto a la cual es capaz de inducir una respuesta en el 50% de la población; en este caso, la respuesta es la no germinación de las especies vegetales (Chen et al., 2013). Para el experimento se prepararon 6 diluciones seriadas 1:2 entre  $0,4 \text{ g L}^{-1}$  y  $15 \text{ g L}^{-1}$ ; también se añadió al ensayo la concentración  $5 \text{ g L}^{-1}$  por ser una de las utilizadas en el experimento de solubilidad. El NaAOT resultó ser tóxico a todas las concentraciones ensayadas (datos

no mostrados; ver Anexo I). Por otro lado, dado que TX-100 funcionó mejor a  $5 \text{ g L}^{-1}$  y es el otro compuesto que consiguió aumentar la solubilidad de los 4 isómeros de HCH, se comprobó si su toxicidad disminuía a esta concentración. A  $5 \text{ g L}^{-1}$ , *L. perenne* germinó al 75 % y *T. pratense*, al 40 %, en tanto que a  $15 \text{ g L}^{-1}$  lo hicieron al 60 y 15 %. Además, *L. perenne* presentó un crecimiento de tallo y raíz de (media $\pm$ desviación típica):  $0,74 \pm 0,62 \text{ cm}$  y  $1,14 \pm 0,48 \text{ cm}$ , respectivamente, aumentando el crecimiento del tallo hasta 7 veces el observado a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$  y duplicando también el tamaño de la raíz. *T. pratense* presentó un crecimiento de tallo de  $2,64 \pm 1,44 \text{ cm}$ , mucho mayor que el observado a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,49 \pm 0,56 \text{ cm}$ ). Los resultados demostraron que a una menor concentración se obtenía un mayor porcentaje de germinación y un mayor crecimiento en ambas especies.

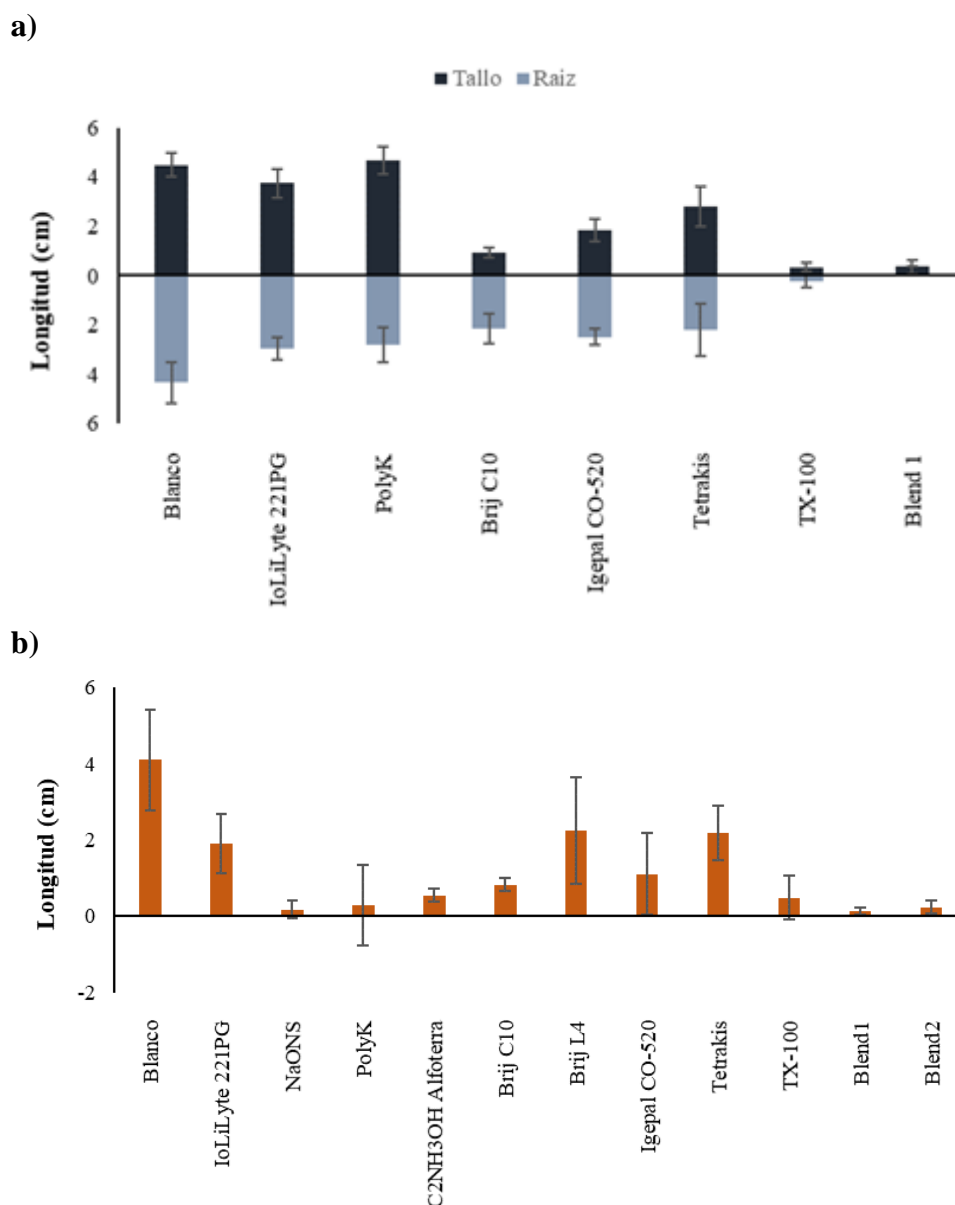


Fig. 13 Crecimiento temprano de *Lolium perenne* (a) y *Trifolium pratense* (b), en el ensayo de ecotoxicidad de *Surface-Active Ionic Liquids* o *SAILs* y surfactantes en especies vegetales. El resultado se expresa como longitud en cm del tallo, en las dos especies, y de raíz en el caso de *L. perenne*. El crecimiento de tallo y de raíz en *L. perenne* se indican con colores distintos.

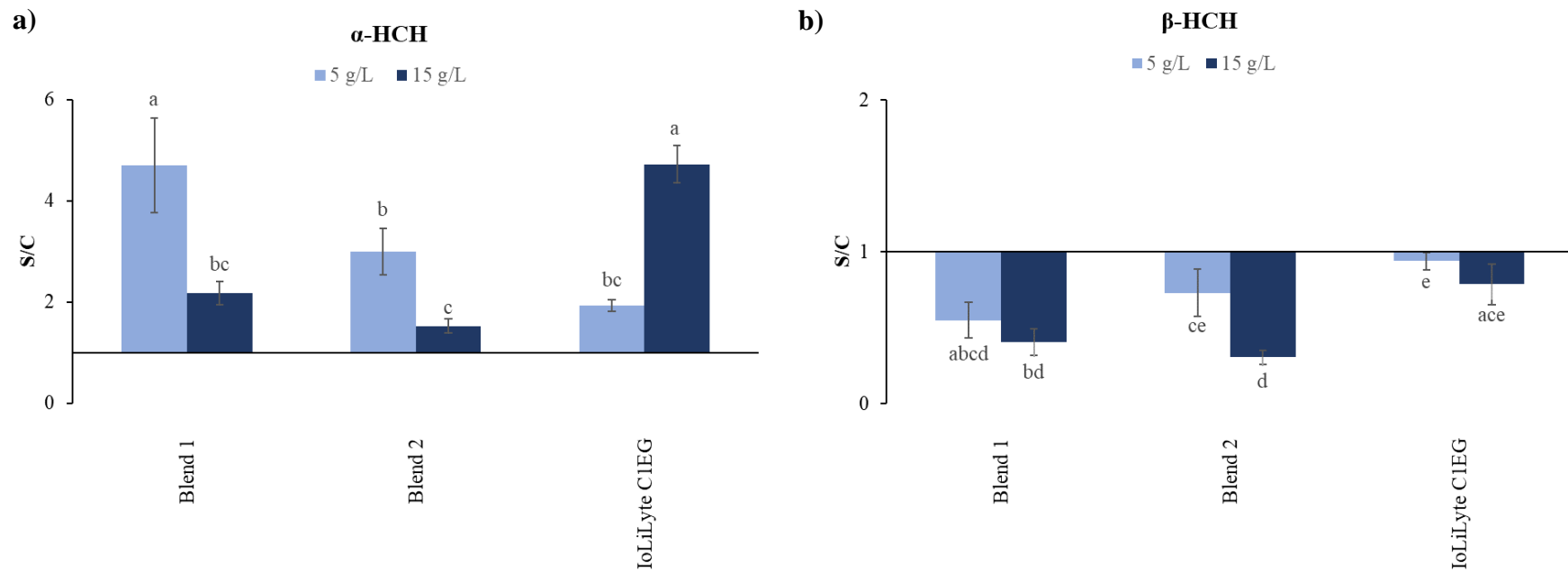
### 3.4. EFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE UN *SAIL* CATIÓNICO (IoLiLyte C1EG) Y UN SURFACTANTE ANIÓNICO (DBS)

De forma adicional, se estudió el efecto sinérgico de una mezcla de un líquido iónico catiónico y un surfactante aniónico a distintas proporciones sobre la solubilidad aparente de HCH: Blend 1 es una mezcla equitativa de dodecibenceno sulfonato o DBS e IoLiLyte C1EG (44,69% DBS + 55,31% IoliLyte C1EG, p/p), mientras que Blend 2 tiene una

mayor proporción de IoLiLyte C1EG (73,68% DBS + 26,32% IoliLyte C1EG, p/p) (ver Tabla 2).

Tanto con Blend 1 y Blend 2 como con IoLiLyte C1EG se obtuvo un aumento de la solubilidad de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, pero no de  $\beta$ - ni  $\delta$ -HCH. Blend 1 y Blend 2 funcionaron mejor a la concentración más baja ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que IoLiLyte C1EG lo hizo a la concentración más alta ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ). Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos, se realizó un ANOVA. A la concentración indicada antes, no se observaron diferencias significativas entre Blend 1, Blend 2 e IoLiLyte C1EG, excepto para el isómero alfa (*i.e.* para  $\alpha$ -HCH, Blend 1 ~ IoLiLyte C1EG > Blend 2 y para  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, Blend 1 ~ IoLiLyte C1EG ~ Blend 2) (ver Fig. 14).

También se determinó la ecotoxicidad de las mezclas de líquido iónico y surfactante sobre la germinación y crecimiento temprano de *L. perenne* y *T. pratense*, observándose una menor toxicidad de las mezclas Blend 1 y Blend 2 en comparación con IoLiLyte C1EG individualmente. Ninguna de las especies vegetales del experimento germinó en presencia de IoLiLyte C1EG, en tanto que *L. perenne* si germinó en presencia de Blend 1 y *T. pratense*, de Blend 1 y 2 (ver Fig. 12). No obstante, el crecimiento de las dos especies se vio inhibido o retardado en presencia de ambas mezclas (ver Fig. 13).



**Fig. 14** Capacidad de solubilización de las dos mezclas de un líquido iónico catiónico con un surfactante aniónico (Blend 1 y 2) y el líquido iónico catiónico individual (IoLiLyte CIEG) sobre los cuatro isómeros de hexaclorociclohexano (HCH):  $\alpha$ -HCH (a),  $\beta$ -HCH (b),  $\gamma$ -HCH (c) y  $\delta$ -HCH (d). La capacidad de solubilización se representa como los datos de solubilidad del isómero obtenidos en presencia del *Surface-Active Ionic Liquid* o *SAIL* y surfactante normalizados frente a los obtenidos en el control (S/C). Los colores de las barras indican las dos concentraciones ensayadas y las letras, las diferencias significativas existentes entre los *SAILs*/surfactantes aplicados a 5 y 15 g L<sup>-1</sup>.

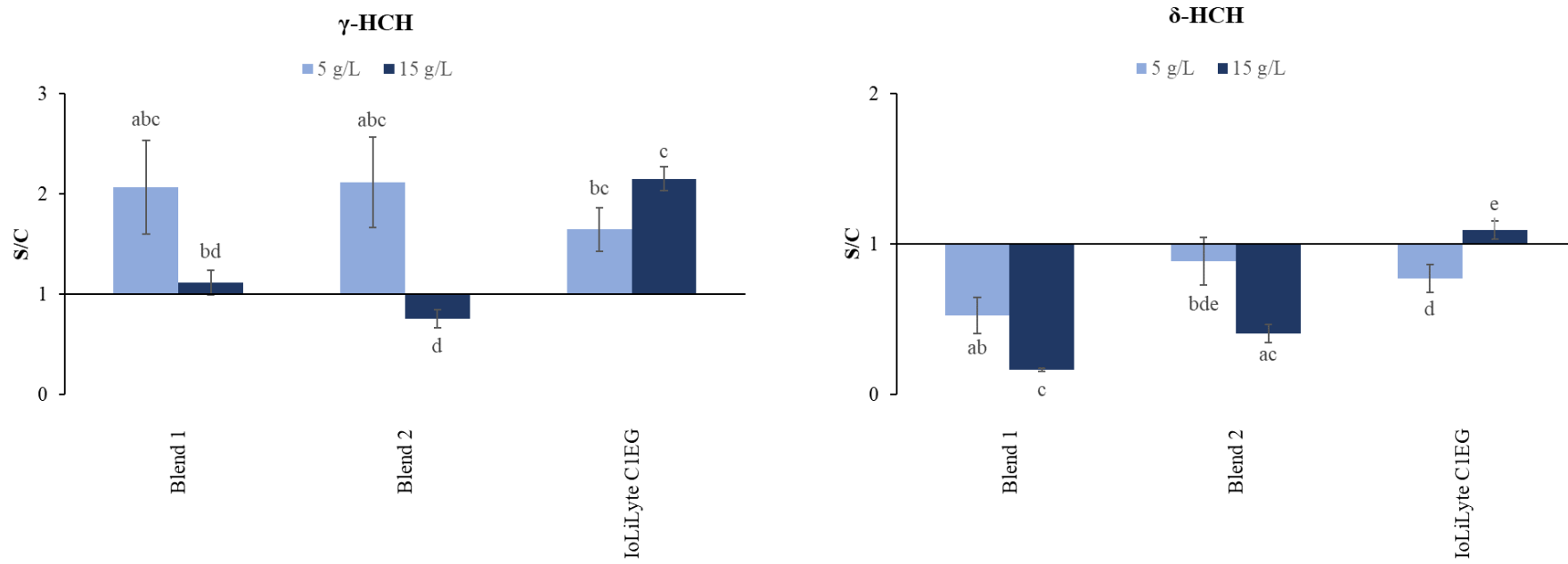


Fig. 14 (cont.)

## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Este estudio demuestra la modificación de la solubilidad aparente en agua de HCH por *SAILs* y surfactantes de tipo catiónico, aniónico y no iónico, con diferentes características (ver Tabla 2) para su potencial aplicación en la mejora de la biodisponibilidad de este compuesto en suelos.

### 4.1. MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE HCH EN PRESENCIA DE *SAILs* Y SURFACTANTES

Los datos de la solubilidad del conjunto de los isómeros de HCH en presencia de los *SAILs*/surfactantes mejoraron en la mayoría de los casos, en al menos una de las concentraciones ensayadas, mostrando un aumento de más de dos veces la obtenida en el control con algún compuesto (*e.g.* NaAOT a 15 g L<sup>-1</sup> y TX-100 a 5 g L<sup>-1</sup>).

La modificación de la solubilidad de HCH respecto al control variaba según la estructura del *SAIL*, según la concentración utilizada (5 g L<sup>-1</sup> o 15 g L<sup>-1</sup>) y el isómero de HCH analizado ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - o  $\delta$ -HCH) (ver Fig. 7). Considerando que la solubilidad del HCH aumenta respecto al control cuando  $S/C > 1$ , se puede decir que los *SAILs*/surfactantes aniónicos tienen una capacidad de solubilización mayor que los *SAILs* catiónicos o los surfactantes no iónicos. Todos los aniónicos consiguieron aumentar la solubilidad del conjunto de isómeros de HCH por encima de la solubilidad obtenida en el control entre 1,25 y 2,15 veces y además, la mayoría de los *SAILs*/surfactantes que obtuvieron resultados significativamente notables fueron aniónicos (NaAOT, Lauryl y ChC12).

La solubilidad de los isómeros de HCH en presencia de *SAILs*/surfactantes aumentó, de forma individual, de 1,5 a 6 veces con respecto a la obtenida en el control. Si se comparan en detalle los resultados (ver Fig. 8, 9 y 10), la capacidad de solubilización de un *SAIL*/surfactante varía según el isómero de HCH, así, puede decirse que los *SAILs*/surfactantes presentan diferencias de afinidad por los distintos isómeros, ofreciendo mejores o peores resultados según cuál sea el isómero de interés. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores *e.g.* Manickam et al. (2012) realizó un estudio sobre la solubilización de HCH por acción de tres biosurfactantes y su posterior efecto en la degradación de HCH en el que también observó un menor aumento de la solubilidad de beta y delta en comparación con el de alfa y gamma. Explican que esta diferencia puede deberse a las propiedades estructurales de los isómeros, su

termodinámica en fase acuosa y la disposición espacial de sus Cl. Los isómeros beta y delta, por un lado, y alfa y gamma, por otro, tienen una conformación espacial similar debido a la posición axial/ecuatorial de los cloros ( $\beta$ -HCH: eeeeee y  $\delta$ -HCH: aeeeee;  $\alpha$ -HCH: aaeeee y  $\gamma$ -HCH: aaeeee), lo cual puede afectar a las interacciones con las micelas de los *SAILs*/surfactantes haciendo más o menos efectiva su solubilización. Esta teoría se ve respaldada por el coeficiente de correlación de Pearson, que resultó ser muy fuerte para  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH ( $\rho = 0,845$  a  $C_S = 5 \text{ g L}^{-1}$  y  $\rho = 0,839$  a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $p < 0.01$ ) y fuerte para  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH ( $\rho = 0,729$  a  $C_S = 5 \text{ g L}^{-1}$  y  $\rho = 0,738$  a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$ ,  $p < 0.01$ ) (ver Fig. 11). Existe una relación entre el comportamiento de los isómeros con conformación similar y su susceptibilidad a la solubilización por acción de *SAILs*/surfactantes. Además, el menor efecto general de los *SAILs*/surfactantes sobre la solubilidad de beta y delta puede justificarse por ser precisamente los isómeros con menor y mayor solubilidad, respectivamente.  $\beta$ -HCH es tan poco soluble en agua que el aumento es difícil que sea significativo y, en el caso de  $\delta$ -HCH, la solubilidad sigue siendo alta y, por lo tanto, la diferencia con el control no se puede apreciar fácilmente.

#### **4.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE *SAIL*/SURFACTANTE SOBRE SU CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN DE HCH**

La concentración tuvo un efecto significativo en la capacidad de solubilización. Los surfactantes no iónicos funcionaron mejor a la menor de las concentraciones ensayadas ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), mientras que la mayoría de compuestos catiónicos y aniónicos presentaron mejores resultados a la mayor concentración ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ). Sin embargo, si se compara en detalle, en el caso de Brij C10 (surfactante no iónico), los resultados fueron significativamente mayores a  $5 \text{ g L}^{-1}$  que a  $15 \text{ mg L}^{-1}$ , siendo esta última más próxima a su CMC (CMC =  $1,366 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esto podría explicarse porque los surfactantes no iónicos tienen una CMC más baja que los *SAILs*/surfactantes aniónicos o catiónicos (ver Tabla 2), y por lo tanto la formación de las micelas en presencia de HCH se produce a concentraciones más bajas, viéndose favorecida la solubilización de HCH a  $C_S = 5 \text{ g L}^{-1}$ . Por otro lado, [C8mim][Cl] y [CYPHOS] tienen CMCs muy similares (ca.  $438$  y  $435 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente; ver Tabla 2), pero el primero funcionó mejor a  $15 \text{ g L}^{-1}$  y el segundo, a  $5 \text{ g L}^{-1}$ . La explicación a esta diferencia de comportamiento radica en el equilibrio entre los monómeros libres y las micelas de la disolución de *SAIL*/surfactante en presencia de HCH: si la CMC se supera en gran medida, se puede producir una desestabilización de las micelas por la presencia de abundantes monómeros libres que rompen el equilibrio de

la disolución. Esta desestabilización se producirá a una mayor o menor concentración según la estructura del *SAIL*/surfactante o el compuesto que se incorpora en el corazón de la micela (HCH).

[C10mim][Cl] fue el único que se ensayó a una concentración por debajo de su CMC (CMC = 14,8 g L<sup>-1</sup>; ver Tabla 2) y los valores de solubilidad de HCH obtenidos a la concentración de 15 g L<sup>-1</sup> fueron significativamente mayores que los obtenidos a una concentración de 5 g L<sup>-1</sup> cuando presumiblemente no había formación de agregados micelares en disolución.

De acuerdo con los datos expuestos, la concentración de *SAILs*/surfactantes necesaria para garantizar una buena capacidad de solubilización de HCH debe estar por encima de la CMC y la proporción C<sub>s</sub>/CMC adecuada, *i.e.* que no consiga desestabilizar las micelas, depende de la estructura del *SAIL*/surfactante y del compuesto que va a solubilizar.

### **4.3. EFECTO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL *SAIL*/SURFACTANTE SOBRE SU CAPACIDAD DE SOLUBILIZACIÓN**

El grado de aumento de la solubilidad aparente de un compuesto por acción micelar depende de varios factores, incluyendo la estructura del surfactante, el número de agregación, geometría de la micela, balance hidrófilo-lipófilo o valor de HLB, fuerzas iónicas, temperatura y tamaño y química del compuesto solubilizado (isómero de HCH, en este caso) (Paria, 2008).

#### **4.3.1. EFECTO DE LA REGIÓN POLAR (HIDRÓFILA)**

Según la bibliografía, la influencia de la región hidrófila de los surfactantes sobre su agregación no está clara. Galgano et al. (2010) compararon las propiedades físicas, CMCs y parámetros termodinámicos de *SAILs* y surfactantes convencionales con diferentes grupos de cabeza (piridinio, imidazolio y amonio cuaternario) y concluyeron que se puede esperar un efecto de la naturaleza de la parte hidrófila en la agregación y posterior solubilización de contaminantes.

Atendiendo a los datos experimentales, se observa que dentro de los *SAILs*/surfactantes catiónicos, el grupo de cabeza (región polar) tiene un efecto en la micelización y solubilización de HCH. Los *SAILs* con amonio cuaternario fueron los que mejores resultados ofrecieron: Benzyl, IoLiLyte C1EG e IoLiLyte T2EG tuvieron valores de S/C significativamente mayores que el resto de *SAILs* catiónicos, especialmente en la

solubilización de  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH, e IoLiLyte 221PG aumentó significativamente la solubilidad de  $\beta$ -HCH respecto a los demás *SAILs* catiónicos ( $S/C = 1,39 \pm 0,32$ ) (ver Fig. 8). En los *SAILs*/surfactantes aniónicos y no iónicos este efecto no fue tan claro (ver Fig. 9 y 10).

#### 4.3.2. EFECTO DE LA REGIÓN APOLAR (HIDRÓFOBA)

La solubilización de hidrocarburos es especialmente dependiente de la longitud de la cadena alquílica hidrófoba de los surfactantes (Paria, 2008). Al aumentar la longitud de la cadena, aumenta el número de agregación y el tamaño del corazón de la micela favoreciendo un aumento de la solubilización. Además, las cadenas saturadas y/o ramificadas tienen menor capacidad de solubilización que las insaturadas y/o simples (Paria, 2008).

En los surfactantes catiónicos se encuentra una relación directa entre el número de carbonos de la cadena alquílica unida al catión y la CMC, explicada por la regla de Klevens (Figueira González, 2017; Łuczak et al., 2008):

$$\log(CMC) = A - Bn_c$$

donde  $n_c$  es el número de carbonos, A una constante que cambia con la naturaleza del grupo hidrofílico y B una constante cercana al valor de  $\log 2$ . Así pues, cada grupo de -CH<sub>2</sub> hace disminuir la CMC un factor de 2. Esto también se observó en *SAILs* de tipo alquilmetilimidazolio (Figueira González, 2017). Es decir, si se aumenta la longitud de la cadena alquílica (hidrófoba), disminuye la CMC y se favorece la formación de micelas.

En los datos obtenidos en este experimento, se observó un efecto de la longitud de la cadena alquílica unida a la región polar catiónica sobre la capacidad de solubilización de los compuestos entre [C8mim][Cl] y [C10mim][Cl]. Ambos tienen la misma estructura, pero diferente longitud de cadena. Los resultados de las solubilidades de los isómeros de HCH obtenidas en presencia de [C10mim][Cl] a 15 g L<sup>-1</sup> fueron mayores que en presencia de [C8mim][Cl] a cualquiera de las concentraciones.

Por otro lado, de acuerdo con la investigación de Wang et al. (2008), en los *SAILs* derivados de imidazolio, la naturaleza del anión afecta a las interacciones anión-catión y, por lo tanto, a la CMC y a la forma de agregarse. En su investigación cambió el anión de [C8mim][X], entre ellos X = [Cl<sup>-</sup>] y [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>], y observó un cambio de agregación con una CMC creciente para [Cl<sup>-</sup>] < [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>] y, en consecuencia, una menor facilidad para

formar agregados del [C8mim] con anión [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>]. Contrariamente a lo expuesto por Wang et al. (2008), bajo las condiciones experimentales de este estudio, no se observaron diferencias significativas entre [C8mim][Cl] y [C8mim][Ac] lo que sugiere que, a pesar de que el anión afecte a la formación de las micelas, en este caso no afecta a la capacidad de solubilización de HCH. Lo mismo ocurre con Na Alfoterra y C<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>OH Alfoterra, *SAILs* aniónicos con diferente catión, pero sin diferencias significativas en la modificación de la solubilidad de HCH.

Los resultados obtenidos indican que la capacidad de solubilización de HCH puede no depender sólo de la CMC y la agregación en micelas, sino también del compuesto que se incorpora en el corazón de la micela y las interacciones de carácter físico-químico entre el compuesto y los agregados.

#### 4.3.3. EFECTO DEL PARÁMETRO HLB EN SURFACTANTES

El balance hidrofílico-lipofílico es un parámetro empírico que describe la fracción lipofílica con respecto al peso de la molécula del surfactante. Los valores HLB conocidos de los surfactantes de este estudio siguen el orden creciente: SDS > TX-100 > Brij C10 > Igepal CO-520 > Brij L4 > Tetrakis (ver Tabla 2). La capacidad de solubilización estimada de estos surfactantes, según el aumento de la solubilidad del conjunto de isómeros expresada como S/C, sería de mayor a menor: TX-100 > Brij C10 > SDS > Igepal > Tetrakis > Brij L4. Es decir, que TX-100 y Brij C10 con valores intermedios de HLB (13,5 y 12, respectivamente) obtuvieron mejores resultados que SDS con HLB = 40 o Tetrakis con HLB = 1-7 (ver Tabla 2). Se puede decir que hay por tanto una relación entre el HLB y la capacidad de solubilización de HCH y que la mayor solubilización de HCH se obtiene a valores intermedios de HLB.

#### 4.4. ECOTOXICIDAD DE LOS *SAILs* Y SURFACTANTES EN ESPECIES VEGETALES (GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO TEMPRANO)

Para determinar la potencial aplicabilidad de los *SAILs*/surfactantes en la remediación de suelos contaminados por HCH se realizó también un experimento de ecotoxicidad de los *SAILs*/surfactantes en dos especies vegetales (*L. perenne* y *T. pratense*). Se observó que la ecotoxicidad depende principalmente de la estructura del *SAIL*/surfactante y del organismo modelo empleado, como ya se había concluido en otras investigaciones (Bałczewski et al., 2007; Cvjetko Bubalo et al., 2014; Jastorff et al., 2003).

*T. pratense* y *L. perenne* respondieron de diferente manera a la presencia de los LIs/surfactantes: *L. perenne* (monocotiledónea) es más resistente a la toxicidad de los LIs/surfactantes que *T. pratense* (dicotiledónea), ya que presenta una germinación del 100% en presencia de prácticamente todos los *SAILs*/surfactantes en los que el porcentaje de germinación es positivo (excepto con TX-100). El crecimiento en ambas especies se vio afectado por la presencia de *SAILs*/surfactantes. En general, los mejores resultados de germinación se obtuvieron con surfactantes no iónicos y los peores, con *SAILs* catiónicos.

#### 4.4.1. EFECTO DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL *SAIL*/SURFACTANTE SOBRE SU ECOTOXICIDAD

Según investigaciones anteriores, la toxicidad de los líquidos iónicos en plantas depende principalmente del catión, de la longitud de la cadena alquílica hidrófoba y, en menor medida, del anión. No obstante, la mayoría de las investigaciones se centran en los líquidos iónicos catiónicos más utilizados y no hay datos sobre la toxicidad de líquidos iónicos aniónicos. En general, se cree que los compuestos con mayor longitud de cadena alquílica son más tóxicos que aquellos que tienen cadenas más cortas y que los líquidos iónicos catiónicos con amonio cuaternario o piridinio son menos tóxicos que los que tienen imidazolio o fosfonio (ver Fig. 4). Este criterio no se pudo comprobar en la comparación entre [C8mim][Cl] y [C10mim][Cl], ya que ambos fueron tóxicos para las dos especies vegetales a las dos concentraciones ensayadas. Por el contrario, si se observaron diferencias entre Brij C10 y Brij L4, que tienen diferente número de carbonos en sus cadenas (36 y 20, respectivamente): *L. perenne* presenta una elevada tolerancia a Brij C10 (% germinación = 100; ver Fig. 10), pero no a Brij L4, y *T. pratense* presenta una tolerancia similar a Brij C10 y Brij L4 (% germinación = 70 y 65 % respectivamente; ver Fig. 10). Por otro lado, el único *SAIL* catiónico que no presentó toxicidad fue IoLiLyte 221PG. Esto podría deberse a su estructura química: es un amonio cuaternario (ver Tabla 2) y por tanto tiene una toxicidad potencial menor que los demás *SAILs* catiónicos. Sin embargo, de ser así, los demás *SAILs* con amonio cuaternario como grupo de cabeza (región polar) deberían no ser tóxicos o ser menos tóxicos que el resto de *SAILs* catiónicos, lo contrario a lo observado en el experimento. Esto podría explicarse porque tienen una cadena alquílica más compleja, con largas cadenas ramificadas, como es el caso de Aliquat 336, o anillos benceno, como ocurre en Benzyl (ver Tabla 2).

Estos resultados indican que sí parece existir una relación entre la estructura del *SAIL*/surfactante, tanto por el grupo de cabeza como por la cadena alquílica hidrófoba, pero los datos obtenidos son insuficientes para establecer relaciones claras. Es necesario realizar una mayor y más profunda investigación sobre esto. Además, para la aplicación en biorremediación *in situ* sería conveniente realizar un estudio más amplio sobre el comportamiento y la toxicidad de los *SAILS*/surfactantes en suelo y cómo afecta esto a la capacidad de solubilización de HCH.

#### 4.4.2. EFECTO DEL PH Y LA C.E. DE LOS *SAILS* Y SURFACTANTES SOBRE SU ECOTOXICIDAD

En la medición de pH y C.E. de los *SAILS*/surfactantes se obtuvieron valores muy dispares. En general, la C.E. disminuye con la concentración y el pH se mantiene estable. La C.E. es una medida de la concentración total de iones en disolución, de forma que al disminuir la concentración de *SAIL*/surfactante de la disolución, también disminuye la concentración de iones en la disolución. Por esta misma razón, los surfactantes no iónicos presentan C.E.  $\sim 0$  mS/cm.

Se observó que tanto [C8mim][Cl] como [C10mim][Cl] tuvieron valores C.E.  $> 4$  mS  $\text{cm}^{-1}$  a  $15 \text{ g L}^{-1}$ , por lo que podrían resultar tóxicos a esta concentración en una posible aplicación en campo. Observando los datos experimentales (ver Tabla 3), se puede decir que no se encontró ninguna relación entre los valores de pH y las C.E. de los *SAILS*/surfactantes y los porcentajes de germinación de las especies vegetales en el ensayo de ecotoxicidad y que la relación entre la toxicidad y el líquido iónico en cuestión va a depender de forma compleja de varios aspectos de su estructura y su configuración espacial y micelar en disolución.

#### 4.5. EFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE UN *SAIL* CATIÓNICO (IoLiLyte C1EG) Y UN SURFACTANTE ANIÓNICO (DBS)

La utilización de sistemas mixtos de surfactantes de distinto tipo es muy común, sobre todo la combinación de un surfactante iónico y uno no iónico para disminuir su adsorción en el suelo y aumentar su efectividad de eliminación del contaminante (Paria, 2008). También las mezclas de surfactantes aniónicos y catiónicos tienen propiedades únicas que pueden ser muy beneficiosas (Kume et al., 2007; Rodríguez et al. 2017).

Atendiendo a los datos experimentales correspondientes a Blend 1 y Blend 2, combinar un *SAIL* catiónico (Iolilyte C1EG) y un surfactante aniónico (dodecílbenzeno sulfonato o DBS) contribuye a la disminución de la CMC y la toxicidad del líquido iónico, aunque no afecta significativamente a la capacidad de solubilización de HCH. Esto puede resultar útil para futuras investigaciones de búsqueda de un *SAIL*/surfactante óptimo para proyectos de biorremediación *in situ*, en los que interesa utilizar una baja concentración del compuesto, ya sea por cuestiones económicas como ambientales, y una baja toxicidad.

#### 4.6. MARCO DE APLICACIÓN DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS Y

##### PERSPECTIVAS DE FUTURO

La aplicación de líquidos iónicos en remediación de suelos contaminados por contaminantes orgánicos ha sido constatada en varios estudios (Keskin et al., 2008; Ma y Hong, 2012). Sin embargo, estos se centran en tratamientos de remediación de tipo físico-química mediante lavado de suelos o *flushing*. En ambos casos el líquido iónico se utiliza como disolvente en la extracción del contaminante de la fase acuosa y después, ambos se recuperan para la eliminación del contaminante y reutilización del líquido iónico; la diferencia radica en que el lavado es un tratamiento *ex situ* y el *flushing*, *in situ*. Hasta ahora, no se había estudiado la aplicación de líquidos iónicos, en concreto *SAILs*, en proyectos de biorremediación mejorada por surfactantes (*SER*) de suelos contaminados por HCH.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo, los *SAILs* pueden considerarse una opción competitiva en proyectos *SER* de suelos contaminados por HCH y varios de ellos pueden ser propuestos para una mayor investigación con el fin de estudiar su posible aplicación en campo. Si bien es cierto que los compuestos que aumentaron significativamente los cuatro isómeros de HCH fueron surfactantes (NaAOT y TX-100), varios *SAILs* como Benzyl, IoLiLyte C1EG, IoLiLyte T2EG, Lauryl o ChC12, obtuvieron valores notables de S/C para  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH y, a veces, mayores que los obtenidos con NaAOT y TX-100: *e.g.* Benzyl a  $C_S = 15 \text{ g L}^{-1}$  llegó a conseguir un aumento de la solubilidad de  $\alpha$ -HCH *ca.* 6 veces por encima de la obtenida en el control y *ca.* 2 veces la obtenida en presencia de NaAOT. Además, cabe destacar el comportamiento de IoLiLyte 221PG frente a  $\beta$ -HCH, por el que demostró tener especial afinidad siendo este el isómero más recalcitrante de todos (ver Fig. 8), algo que no ocurrió con ningún otro compuesto.

Muchos de los *SAILs* mencionados previamente resultaron ser tóxicos en el experimento de ecotoxicidad, esto implica que las posibilidades de aplicación *in situ* podrían verse reducidas. No obstante, los procesos de sorción-desorción en el suelo podrían influir en la toxicidad de estos compuestos una vez fuesen aplicados, de modo que sería necesario hacer un estudio más amplio y profundo sobre el comportamiento de estos compuestos en el suelo y, si pudiera ser, teniendo en cuenta la naturaleza del suelo objetivo de remediación. Además, la concentración utilizada en la experimentación es alta y trabajar a una concentración menor restaría toxicidad (como se pudo comprobar con TX-100) y disminuiría los costes, así que también sería conveniente describir la curva de dosis-respuesta con la  $EC_{50}$  del líquido iónico en cuestión para establecer una dosis efectiva de aplicación.

La gran ventaja de los *SAILs* es su versatilidad estructural y la oportunidad que ofrecen para el diseño de un líquido iónico óptimo con propiedades específicas de interés para una aplicación determinada. El estudio en este trabajo de una gran variedad de compuestos con distintas propiedades físico-químicas y estructuras permite elaborar un *screening* inicial para la selección de líquidos iónicos que requieren mayor investigación para proyectos de biorremediación o para tener en cuenta en el diseño de un líquido iónico específico de tarea o *Task-Specific Ionic Liquid (TSIL)*. Así pues, los *SAILs* con buenos resultados en solubilización de HCH y en el experimento de ecotoxicidad (*e.g.* IoLiLyte 221PG) se propondrían para una mayor investigación para su uso en biorremediación *in situ*. Sin embargo, en el caso de aquellos que tienen buenos resultados en la solubilización de HCH y no tan buenos en el experimento de ecotoxicidad, se podría contemplar variar su estructura de acuerdo a las recomendaciones para el diseño de líquidos iónicos menos tóxicos (ver Fig.4); o bien, estudiar su efectividad en proyectos de biorremediación *ex situ*, en biorreactores o biopilas, si se consiguiese determinar una concentración que no afectase a la población microbiana y, si no fuera este el caso, en proyectos de lavado de suelo o *flushing*. Debido a la diferencia de afinidad de los *SAILs* por los isómeros de HCH, se propone una selección en función del isómero mayoritario en el suelo: si el isómero predominante fuese  $\alpha$ -HCH, se propondría para un mayor estudio a Benzyl o Lauryl, que para este isómero consiguieron S/C *ca.* 6 y *ca.* 5, respectivamente; si fuese  $\beta$ -HCH, se propondría IoLiLyte 221PG o Lauryl con S/C *ca.* 1,4; y si fuese  $\gamma$ -HCH o  $\delta$ -HCH, se propondría ChC12 que obtuvo S/C *ca.* 2,5 y *ca.* 1,5, respectivamente. En cualquier caso, dichos *SAILs*, excepto IoLiLyte 221PG, resultaron ser tóxicos en el experimento de

ecotoxicidad en especies vegetales y requerirían un mayor estudio de su toxicidad y comportamiento en el suelo para definir el tipo de tratamiento. Nótese que se han obviado en estas consideraciones a NaAOT y TX-100 por ser estos surfactantes convencionales y no *SAILS*, aunque teniendo en cuenta los buenos resultados en la solubilización de HCH y de ecotoxicidad, en el caso de TX-100, también deberían valorarse en futuras investigaciones de *SER* de suelos contaminados por residuos de HCH.

Por otro lado, en la selección del *SAIL* es necesario considerar no sólo su capacidad de solubilización de HCH y su toxicidad, sino también su biodegradabilidad y adsorción en el suelo. La efectividad del *SAIL* podría disminuir si la mayor parte queda retenida en el suelo o si se degrada antes que el propio contaminante, además del coste económico que podría suponer. Si su persistencia es alta, el *SAIL* podría acabar convirtiéndose en un contaminante más. Según varias investigaciones, la adsorción en suelos parece depender tanto del *SAIL* como de la naturaleza del suelo. Los líquidos iónicos catiónicos con anillos de imidazolio o piridinio, pueden quedar fuertemente adsorbidos por interacciones electrostáticas (Cvjetko Bubalo et al., 2014; Mroziak et al., 2013); además, las largas cadenas alquílicas pueden formar más enlaces con las partículas del suelo y, en consecuencia, favorecer su retención en este (Cvjetko Bubalo et al., 2014; Thuy Pham et al., 2010). La adsorción en el suelo puede variar según la naturaleza y propiedades del suelo como el contenido en materia orgánica y arcilla o la capacidad de intercambio catiónico (Cvjetko Bubalo et al., 2014; Studzińska et al., 2009). La biodegradabilidad depende principalmente de la estructura del líquido iónico (ver Fig. 4). Así pues, sería necesario hacer un estudio previo del suelo objetivo de la remediación y el comportamiento del *SAIL* en este para el establecimiento de las dosis efectivas.

Los datos obtenidos con las mezclas Blend 1 y Blend 2 (ver Fig. 12) de un líquido iónico catiónico (IoLiLyte C1EG) y un surfactante aniónico (dodecibenceno sulfonato o DBS) demuestran una reducción de la CMC y de la toxicidad frente a los datos obtenidos con el líquido iónico catiónico individual, de modo que la combinación de un líquido iónico y un surfactante podría ser la “panacea” en el diseño de *SAILS* óptimos para proyectos de *SER* de suelos contaminados.

Es importante también considerar que el aumento de la biodisponibilidad de HCH debe estar en equilibrio con la ratio de degradación de los microorganismos, ya que, de no ser así, podría suponer un problema de contaminación de las aguas subterráneas por

lixiviación. Por ello, los estudios de aumento de biodisponibilidad en suelo, siempre deben ir acompañados de estudios de riesgos.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- La mayoría de los *SAILs*/surfactantes utilizados en este experimento aumentaron la solubilidad de HCH, en al menos una de las concentraciones ensayadas. Los resultados varían según la estructura del *SAIL*/surfactante, la concentración utilizada ( $5 \text{ g L}^{-1}$  o  $15 \text{ g L}^{-1}$ ) y el isómero de HCH analizado ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - o  $\delta$ -HCH)
- La capacidad de solubilización de los *SAILs*/surfactantes aniónicos es mejor que la de los catiónicos o no iónicos, aunque esta varía según la estructura química del compuesto.
- Por lo general, los *SAILs*/surfactantes muestran diferente afinidad por los isómeros. La solubilidad aparente de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH aumentó de forma más significativa de los *SAILs*/surfactantes ensayados, probablemente debido a la posición mayoritariamente axial de sus átomos de Cl. Los únicos compuestos que fueron capaces de solubilizar los 4 isómeros de forma significativa fueron NaAOT y TX-100 (surfactantes convencionales).
- La concentración utilizada en los ensayos *batch* de extracción de HCH influyó en la capacidad de solubilización de algunos de los *SAILs*/surfactantes. La concentración óptima para la solubilización de HCH debe estar por encima de la CMC de los *SAILs*/surfactantes en una proporción tal que no altere el equilibrio entre micelas y monómeros libres de la disolución y, por lo tanto, desestabilice las micelas. Otras características fisicoquímicas de la conformación de las micelas pueden tener influencia.
- La longitud de la cadena alquílica de la región hidrófoba del *SAIL*/surfactante tiene un efecto significativo sobre su capacidad de solubilización de HCH.
- El contraión en los *SAILs*/surfactantes no parece influir en la capacidad de solubilización de los HCH.
- El valor de HLB tiene relación con la capacidad de solubilización de HCH siendo óptimos valores entre 12 y 13,5.
- La mayoría de los *SAILs*/surfactantes son tóxicos para las dos especies vegetales ensayadas (*Lolium perenne* y *Trifolium pratense*). El grado de toxicidad depende de la especie y del *SAIL*/surfactante. Los surfactantes no iónicos son los menos tóxicos.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- La combinación de un líquido iónico y un surfactante tiene efectos en la reducción de la CMC y su toxicidad, pero no aumenta significativamente a la capacidad de solubilización de HCH del líquido iónico.
- Los resultados indican que los *SAILs* tienen un gran potencial para su aplicación en biorremediación *in situ*, pero es necesaria más investigación sobre su toxicidad, biodegradabilidad y adsorción y es recomendable una evaluación del caso específico.
- La aplicación en técnicas más tradicionales de lavado *ex situ* de suelo ofrece una aplicabilidad más inmediata para los *SAILs* ensayados que aumentaron de forma significativamente la solubilidad aparente del HCH.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abhilash P. C., Singh B., Srivastava P., Schaeffer A. y Singh N. 2013. Remediation of lindane by *Jatropha curcas* L: Utilization of multipurpose species for rhizoremediation. *Biomass & Bioenergy* 51: 189–193.
- Alexander M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 34(20): 4259–4265.
- Amde M., Liu J. F. y Pang L. 2015. Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environmental Science & Technology* 49(21): 12611–12627.
- Arias M., López E., Martínez E., Simal J., Mejuto J. C. y García L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123: 247–260.
- Bałczewski P., Bachowska B., Białas T., Biczak R., Wieczorek W. M. y Balińska, A. 2007. Synthesis and phytotoxicity of new ionic liquids incorporating chiral cations and/or chiral anions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(5): 1881–1892.
- Bhatnagar V. K., Kashyap R., Zaidi S. S. A., Kulkarni P. K. y Saiyed H. N. 2004. Levels of DDT, HCH, and HCB Residues in Human Blood in Ahmedabad, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72(2): 261–265.
- Blasco C., Lino C. M., Picó Y., Pena A., Font G. y Silveira M. I. N. 2004. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *Journal of Chromatography A* 1049(1–2): 155–160.
- Braga A. M. C. B., Krauss T., Reis dos Santos C. R. y Mesquita de Souza P. 2002. PCDD/F-contamination in a hexachlorocyclohexane waste site in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* 46(9–10): 1329–1333.
- Calvelo Pereira R., Monterroso C., y Macías F. 2010. Phytotoxicity of hexachlorocyclohexane: Effect on germination and early growth of different plant species. *Chemosphere* 79(3): 326–333.
- Castillo Borja F. 2015. Líquidos Iónicos: Métodos de Síntesis y Aplicaciones. *Conciencia Tecnológica* 49: 52–56.
- Chen Z., Bertin R. y Frolidi G. 2013. EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry* 138(1): 414–420.
- Cheng N., Ma X., Sheng X., Wang T., Wang R., Jiao J. y Yu L. 2014. Aggregation behavior of anionic surface active ionic liquids with double hydrocarbon chains in aqueous solution: Experimental and theoretical investigations. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 453(1): 53–61.

- Concha E., Turnes M. I., Muniategui S., López P., Prada D. y Fernández E. 2006. Evaluation of HCH isomers and metabolites in soils, leachates, river water and sediments of a highly contaminated area. *Chemosphere* 64(4): 588–595.
- Cornellas A., Perez L., Comelles F., Ribosa I., Manresa A. y Garcia T. T. 2011. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 355(1): 164–171.
- Coscolla R. 2013. Residuos de pesticidas en alimentos vegetales. España. Mundiprensa.
- Cvjetko Bubalo M., Radošević K., Radojčić Redovniković I., Halambek J. y Gaurina Srček V. 2014. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 99: 1–12.
- Ehlers L. J. y Luthy R. G. 2003. Contaminant bioavailability in Soil and Sediment. *Environmental Science & Technology* 37: 295A – 302A.
- El-Shahawi M. S., Hamza A., Bashammakh A. S. y Al-Saggaf W. T. 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80(5): 1587–1597.
- Erkmen B. y Kolankaya D. 2006. Determination of organochlorine pesticide residues in water, sediment, and fish samples from the Meriç Delta, Turkey. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 86(1–2): 161–169.
- Figueira González M. 2017. Formación de micelas, microemulsiones y vesículas por autoagregación de líquidos iónicos (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
- Fuscoletti V., Achene L., Gismondi F., Lamarra D., Lucentini L., Spina S., Veschetti E. y Turrio-Baldassarri L. 2015. Presence of epsilon HCH together with four other HCH isomers in drinking water, groundwater and soil in a former lindane production site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 95(1): 108–115.
- Galgano P. D. y El Seoud O. A. 2010. Micellar properties of surface active ionic liquids: A comparison of 1-hexadecyl-3-methylimidazolium chloride with structurally related cationic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 345(1): 1–11.
- González H., Torres L., Mondaca I., Cortés J y Gortarés-Moroyoqui P. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva* 3(9): 120-145.
- Jastorff B., Störmann R., Ranke J., Mölter K., Stock F., Oberheitmann B., Hoffmann W., Hoffmann J., Nüchter M., Ondruschka B. y Filser J. 2003. How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chemistry* 5(2): 136–142.
- Keskin S., Akman U. y Hortaçsu Ö. 2008. Soil remediation via an ionic liquid and supercritical CO<sub>2</sub>. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47(9–10): 1693–1704.
- Kume G., Gallotti M. y Nunes G. 2007. Review on Anionic/Cationic Surfactant Mixtures.

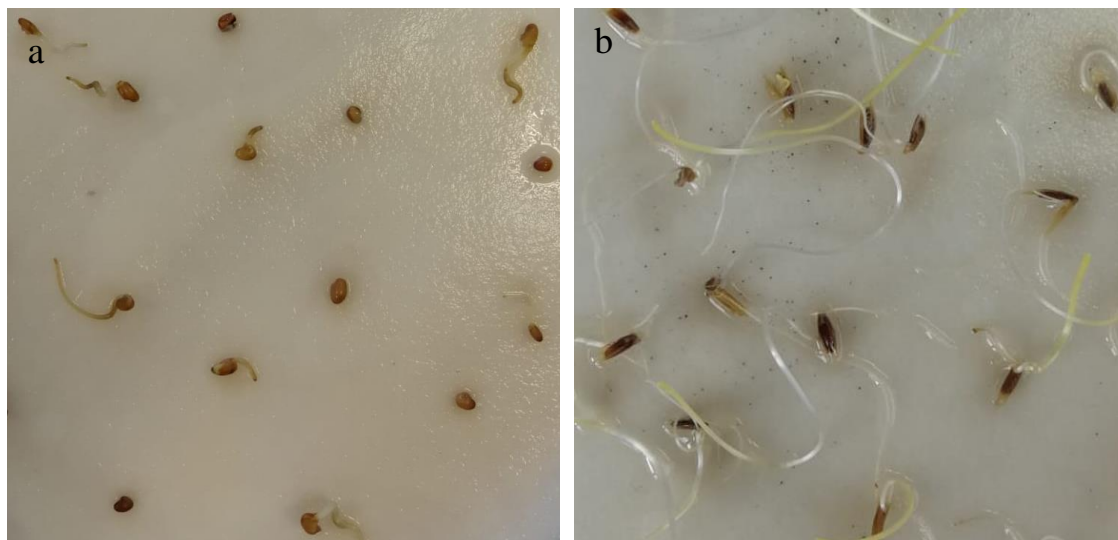
- Journal of Surfactants and Detergents* 11: 1-11.
- Kutz F. W., Wood P. H. y Bottimore D. P. 1991. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 120: 1–82.
- Lal R., Pandey G., Sharma P., Kumari K., Malhotra S., Pandey R., Raina V., Kohler H. P. E., Holliger C., Jackson C. y Oakeshott J. G. 2010. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1): 58–80.
- Lammel G., Ghim Y. S., Grados A., Gao H., Hühnerfuss H. y Lohmann R. 2007. Levels of persistent organic pollutants in air in China and over the Yellow Sea. *Atmospheric Environment* 41(3): 452–464.
- Li J., Zhu T., Wang F., Qiu X. H. y Lin W. L. 2006. Observation of organochlorine pesticides in the air of the Mt. Everest region. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(1): 33–41.
- Lombi E. y Hamon R. E. 2004. Remediation of Polluted Soils. *Encyclopedia of Soils in the Environment* 4: 379–385.
- Łozowicka B., Kaczyński P., Wolejko E., Piekutin J., Sagitov A., Toleubayev K., Isenova G. y Abzeitova E. 2016. Evaluation of organochlorine pesticide residues in soil and plants from east Europe and central Asia. *Desalination and Water Treatment* 57(3): 1310–1321.
- Łuczak J., Hupka J., Thöming J. y Jungnickel C. 2008. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 329(3): 125–133.
- Ma J. y Hong X. 2012. Application of ionic liquids in organic pollutants control. *Journal of Environmental Management* 99: 104–109.
- Macdonald R. W., Barrie L. A., Bidleman T. F., Diamond M. L., Gregor D. J., Semkin R. G., Strachan W. M. J., Li Y. F., Wania F., Alae M., Alexeeva L. B., Backus S. M., Bailey R., Bewers J. M., Gobeil C., Halsall C. J., Harner T., Hoff J. T., Jantunen L. M. M., Lockhart W. L., Mackay D., Muir D. C. G., Pudykiewicz J., Reimer K. J., Smith J. N., Stern G. A., Schroeder W. H, Wagemann R. y Yunker M. B. 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *The Science of the Total Environment* 254(2000): 93-234.
- Mackay D., Shiu W. Y., Ma K. y Lee S. C. 2006. Physical-Chemical Properties and Environmental Fate of Organic Pollutants. Florida. *Taylor & Francis Group*.
- Makkar R.S. y Rockne K. J. 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of PAH. *Environtal Toxicology and Chemistry* 22(10): 2280–2292.
- Malik A., Singh K. P. y Ojha P. 2007. Residues of organochlorine pesticides in fish from the Gomti river, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78(5): 335–340.
- Manickam N., Bajaj A., Saini H. S. y Shanker R. 2012. Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by *Sphingomonas* sp. NM05. *Biodegradation* 23(5): 673–682.

- Morillo E. y Villaverde J. 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment* 586: 576–597.
- Mrema E. J., Rubino F. M., Brambilla G., Moretto A., Tsatsakis A. M. y Colosio C. 2013. Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology* 307: 74–88.
- Mrozik W., Jungnickel C., Paszkiewicz M. y Stepnowski P. 2013. Interaction of novel ionic liquids with soils. *Water Air and Soil Pollution* 224(11): 1759.
- Mulligan C. N., Yong R. N. y Gibbs B. F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Engineering Geology* 60(1–4): 371–380.
- OECD. 2006. Test No. 208. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. *OECD Guidelines for the testing of chemicals*. Sección 2. París.
- Paria S. 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science* 138(1): 24–58.
- Pereira R. C., Martínez M. C. M. y Macías F. 2008. El hexaclorociclohexano en Galicia : Algunos datos sobre producción, uso y contaminación. *Edafología* 15(1,2,3): 3-24.
- Phillips T. M., Seech A. G., Lee H. y Trevors J. T. 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16(4): 363–392.
- Quintero J. C., Moreira M. T., Lema J. M. y Feijoo G. 2006. An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere* 63(6): 1005–1013.
- Ranke J., Stolte S., Störmann R., Aming J. y Jastorff B. 2007. Design of sustainable chemical products - The example of ionic liquids. *Chemical Reviews* 107(6): 2183–2206.
- Reindl A. R., Falkowska L., Szumiło E. y Staniszevska M. 2013. Residue of chlorinated pesticides in fish caught in the Southern Baltic. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 42(3): 251–259.
- Ren X., Zeng G., Tang L., Wang J., Wan J., Liu Y., Yu J., Yi H., Ye S. y Deng R. 2018. Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Science of the Total Environment* 610–611: 1154–1163.
- Rodríguez I., Puerto M. C., Miller C. A. y Soto A. 2017. Ionic liquids for low-tension oil recovery processes: Phase behavior tests. *Journal of Colloid and Interface Science* 504: 404–416.
- Rodríguez Garrido B. 2009. Movilidad , biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de Hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela.
- Sakthivel S., Velusamy S., Nair V. C., Sharma T. y Sangwai J. S. 2017. Interfacial tension of crude oil-water system with imidazolium and lactam-based ionic liquids and their evaluation for enhanced oil recovery under high saline environment. *Fuel* 191: 239–250.

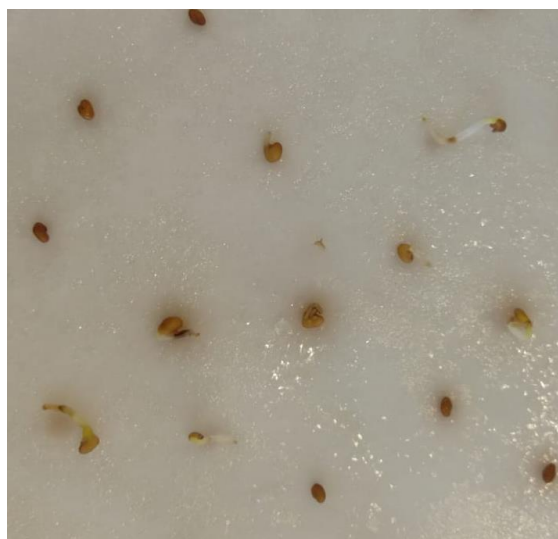
- Semple K. Y., Doick K. J., Jones K. C., Burauel P., Craven A. y Harms H. 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* 38(12): 228A-231A.
- Semple K. T., Doick K. J., Wick L. Y. y Harms H. 2007. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution* 150(1): 166–176.
- Srinivasa Rao K., Gehlot P. S., Trivedi T. J. y Kumar A. 2014. Self-assembly of new surface active ionic liquids based on Aerosol-OT in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science* 428: 267–275.
- Studzińska S., Kowalkowski T. y Buszewski B. 2009. Study of ionic liquid cations transport in soil. *Journal of Hazardous Materials* 168(2–3): 1542–1547.
- Szpyrka E., Kurdziel A., Matyaszek A., Podbielska M., Rupa J. y Slowik-Borowiec M. 2015. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from the region of south-eastern Poland. *Food Control* 48: 137-142.
- Thuy Pham T. P., Cho C. W. y Yun Y. S. 2010. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Research* 44(2): 352–372.
- Vega M., Romano D. y Uotila E. 2016. El lindano (contaminante orgánico persistente) en la UE. Dirección general de políticas internas. Departamento C: Derechos de los ciudadanos y asuntos constitucionales. Peticiones (PE) 571.398 Disponible en: [http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/571398/IPOL\\_STU\(2016\)571398\\_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/STUD/2016/571398/IPOL_STU(2016)571398_EN.pdf)
- Vijgen J. 2006. The Legacy of Lindane HCH Isomer Production. Main Report. A Global Overview of Residue Management, Formulation and Disposal. *International HCH & Pesticides Association*.
- Vijgen J., Abhilash P. C., Li Y. F., Lal R., Forter M., Torres J., Singh N., Yunus M., Tian C., Schäffer A. y Weber R. 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs-a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environmental Science and Pollution Research* 18(2): 152–162.
- Vijgen J., Aliyeva G. y Weber, R. 2013. The Forum of the International HCH and Pesticides Association - a platform for international cooperation. *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 2081–2086.
- Vijgen J., de Borst B., Weber R., Stobiecki T. y Forter M. 2019. HCH and lindane contaminated sites: European and global need for a permanent solution for a long-time neglected issue. *Environmental Pollution* 248: 696–705.
- Walker K., Vallero D. A. Lewis R. G. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other. *Environmental Science & Technology* 33(24): 4373–4378.
- Wang H., Wang J., Zhang S. y Xuan X. 2008. Structural effects of anions and cations on the aggregation behavior of ionic liquids in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry B* 112(51): 16682–16689.
- Weber R., Aliyeva G. y Vijgen J. 2013. The need for an integrated approach to the global challenge of POPs management. *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 1901–1906.

- Willett K. L., Ulrich E. M. y Hites R. A. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science & Technology* 32(15): 2197–2207.
- Witczak A. y Pohorylo A. 2015. The estimation of consumer health risk associated with organochlorine xenobiotics in hard smoked cheese in Poland. *Journal of Environmental Science and Health* 50: 595-606.

**ANEXO I: FOTOGRAFÍAS DE LOS SIGNOS DE TOXICIDAD  
OBSERVADOS EN EL ENSAYO DE ECOTOXICIDAD EN  
PLANTAS**



**Fig. 1** Germinación y crecimiento temprano en semillas de *Trifolium pratense* (a) y *Lolium perenne* (b) en presencia de PolyK. Se observan signos de toxicidad en las semillas de *Trifolium pratense* (a).



**Fig. 2** Signos de toxicidad observados en el experimento de ecotoxicidad para la medición de la germinación y crecimiento temprano en semillas de *Trifolium pratense* en presencia de NaONS.



**Fig. 3** Signos de toxicidad observados en semillas de *Trifolium pratense* (trébol rojo) en presencia de NaAOT a la concentración de  $0,4\text{gL}^{-1}$