

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Facultat de Ciències
Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia

**ACCIÓ DELS SUAVITZANTS TÈXTILS EMULSIONATS I
MICROEMULSIONATS EN EL MEDI AQUÀTIC.**
Ecotoxicitat i estudi histopatològic

Memòria presentada per a optar al grau de Doctor
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Anna Bettina Vallès i Malet
Bellaterra, 2001

El present treball d'investigació recollit en la present memòria ha estat realitzat per Anna Bettina Vallès i Malet, per a optar al Grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona. La part experimental ha estat realitzada al Laboratori de Toxicologia Ambiental de l'Institut d'Investigació Tèxtil de Terrassa (INTEXTER) de la Universitat Politècnica de Catalunya i en el Laboratori de Biologia de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció de la Dra. M^a Carme Riva i Juan (INTEXTER, Universitat Politècnica de Catalunya) i de la Dra. Carolina Sanpera i Trigueros (Universitat de Barcelona).

Terrassa, Març 2001

Dra. M^a Carme Riva i Juan

Dra. Carolina Sanpera i Trigueros

Als meus pares
Als meus germans i a la seva prole

Al Sebas

AGRAÏMENTS

En primer lloc voldria expressar el meu agraïment a les Dres.M^a Carmen Riva i Carolina Sanpera per haver-me acceptat sota la seva direcció i haver tingut tanta paciència amb mi durant tots aquests anys, que han estat molts.

També voldria agrair a la Dra. Sílvia Crespo, tutora d'aquest treball, per haver-me deixat fer part d'aquesta tesi en el seu laboratori i pel seu ajut desinteressat en la realització d'aquesta.

Al Dr. F.J. Carrión, del Lab. de Detergència i Tensioactius de l'INTEXTER, qui em va suministrar els productes amb els que he realitzat aquest treball.

A la Carola, una gran amiga, que sense el seu ajut i estímulo incondicionals no hagués acabat aquest treball, i per la paciència i confiança dipositada en mí.

A la Xus, a la Roser i al Sito per la seva gran amistat, el seu suport i la seva col laboració incondicional en tot moment, sobretot en els més difícils.

A la Diana, l'Andreu i al Manel, els meus amics i companys en l'Institut pel seu gran suport en tot moment.

A la Dra. Eulàlia Gríful, pel seu assessorament i ajut en l'estudi estadístic i interpretació dels resultats.

Als companys de la Unitat de Zoologia, Maite i Fernando, i a la secretària Pilar, pels ànims donats i per l'ajut rebut en aquests últims temps.

Als companys del Lab de Biologia de la Facultat de Veterinària durant tants anys, l'Encarna, la Montse, el Carles i el Carlos Arturo pel seu companyerisme i ajut.

Als companys del Laboratori de Contaminació Ambiental, amb els qui vaig estar en els meus primers anys a l'Institut, el Dr. Crespi, Dra. M^a Carmen Gutiérrez, Montse Raspall i Mercè Vilaseca, dels qui vaig aprendre molt.

A tots els companys que durant aquests anys han anat passat pel laboratori, sobretot a la Sonia Ruiz, Núria Garrido, Núria Portell i Montse García.

A la Maise Simó, del Lab. de Detergència i Tensioactius, pel seu ajut en la preparació dels productes utilitzats.

A tot el personal de l'INTEXTER, que han estat companys de feina i moltes vegades m'han donat ànims per a poder-la acabar.

Al personal del Servei de Microscòpia Electrònica de la UAB, per l'ajuda rebuda i la paciència en explicar-me el funcionament i manipulació dels microscopis electrònics de transmissió i d'escànnig cada cop que els necessitava, que n'eren moltes.

Als meus pares i germans, que m'han donat suport i ajut en tot moment.

Per últim, tinc que donar les gràcies molt sinceres a dues persones que sense el seu suport, ajut i amistat aquest treball faria temps que hauria anat a parar a les escombraries. Al David, per la seva amistat incondicional des de fa molt anys, per haver-me suportat i ajudat a superar moltes de les crisis que m'han suposat acabar de realitzar aquesta tesi. I al Sebas, qui en aquests últims mesos m'ha ajudat en tot, en paraules i fets, i ha cregut en mi.

A tots vosaltres, gràcies.

1. PRESENTACIÓ DEL TEMA	1
2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	3
3. CARACTERITZACIÓ I TOXICITAT AGUDA DELS SUAVITZANTS CATIÒNICS. EFECTES AMBIENTALS	7
3.1. INTRODUCCIÓ	7
3.1.1. Tensioactius	7
3.1.1.1. Estructura química i comportament	7
3.1.1.2. Classificació general	10
3.1.2. Tensioactius catiónics	11
3.1.2.1. Classificació dels tensioactius catiónics	12
3.1.2.1.1. Amines grasses i les seves sals	12
3.1.2.1.2. Amines grasses etoxilades	12
3.1.2.1.3. Sals d'amoni quaternari	13
3.1.2.1.4. Imidazolines quaternàries	14
3.1.2.2. Mètodes de producció de tensioactius catiónic	15
3.1.2.3. Comportament fisico-químic	16
3.1.2.4. Propietats i aplicacions	18
3.1.3. Suavitants	19
3.1.3.1. Rics ambientals dels suavitzants nitrogenats	24
3.1.3.1.1. Producció de matèries primeres	24
3.1.3.1.2. Producció de productes finals.	26
3.1.4. Efectes dels tensioactius en el medi aquàtic	27
3.1.4.1. Biodegradació	29
3.1.4.1.1. Mecanismes de biodegradació	31
3.1.4.1.2. Paràmetres indicatius de la biodegradació	33
3.1.4.1.3. Regulació	35
3.1.4.2. Toxicitat dels tensioactius	36
3.1.4.2.1. Tipus d'assaigs de toxicitat	37
3.1.4.2.2. Factors que influeixen en la toxicitat	39
3.1.4.2.3. Assaigs de toxicitat	42
3.2. MATERIAL I MÈTODES	47
3.2.1. Compostos utilitzats	47
3.2.2. Paràmetres ambientals	48
3.2.2.1. Demanda Biològica d'Oxigen (DBO)	48
3.2.2.2. Demanda Química d'Oxigen (DQO)	49
3.2.2.3. Biodegradació	50
3.2.3. Assaigs de toxicitat aguda	53
3.2.3.1. Bioassaig amb bacteris luminescents (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	54

3.2.3.2. Determinació de la inhibició del creixement algal (<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> i <i>Selenastrum capricornutum</i>)	55
3.2.3.3. Determinació de la inhibició de la mobilitat en dàfnies (<i>Daphnia magna</i>)	58
3.2.3.4. Assaig de toxicitat aguda en peixos (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	60
3.2.4. Mètodes estadístics	61
3.3. RESULTATS	65
3.3.1. Característiques i comportament ambiental	65
3.3.1.1. Demanda Química d'Oxigen	65
3.3.1.2. Demanda Biològica d'Oxigen	66
3.3.1.3. Biodegradació	66
3.3.2. Biodegradació/Toxicitat en bacteris luminescents	70
3.3.3. Toxicitats agudes	73
3.3.3.1. Toxicitat aguda en bacteris luminescents	73
3.3.3.2. Toxicitat aguda en microalgues	81
3.3.3.3. Toxicitat aguda en dàfnies	104
3.3.3.4. Toxicitat aguda en peixos	112
3.3.3.5. Toxicitat aguda dels agents microemulsionants	117
3.3.3.6. Anàlisi de comportament múltiple entre totes les espècies	118
3.4. DISCUSSIÓ	123
3.4.1. Paràmetres ambientals	123
3.4.1.1. Demanda biològica d'oxigen i demanda química d'oxigen	123
3.4.1.2. Biodegradació	125
3.4.1.3. Biodegradació/Toxicitat en bacteris luminescents	129
3.4.2. Toxicitats agudes (Sistema multiespècies)	131
4. ASSAIG DE TOXICITAT SUBCRÒNICA; EFECTES HISTOPATOLÒGICS EN TRUITA IRISADA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	147
4.1. INTRODUCCIÓ	147
4.1.1. Estudi Histopatològic	147
4.1.1.1. Brànquia	148
4.1.1.2. Fetge	150
4.2. MATERIAL I MÈTODES	153
4.2.1. Tractament subcrònic	153
4.2.2. Estudi estructural dels òrgans	153
4.2.2.1. Fixació i inclusió de les mostres en parafina. Estudi a microscòpia òptica.	154
4.2.2.2. Fixació i inclusió de les mostres en Araldite. Estudi a microscòpia òptica i electrònica de transmissió (MET).	155

4.2.2.3. Microscòpia electrònica d'escànnig (MES)	157
4.3. RESULTATS	159
4.3.1. Estudi histopatològic de la truita irisada (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	159
4.3.1.1. Histopatologia de la Brànquia	159
4.3.1.2. Histopatologia del Fetge	178
4.4. DISCUSIÓ	191
4.1. Brànquia	191
4.2. Fetge	198
5. CONCLUSIONS	201
6. BIBLIOGRAFIA	203
7. ANNEXES	225

1. PRESENTACIÓ DEL TEMA

Els suavitzants tèxtils són productes que un cop aplicats als materials tèxtils els aporten una sèrie de propietats desitjables per a l'usuari final, entre les que cal destacar la millora del sentit del tacte ja que els hi aporten suavitat, i els fan més agradables i llisos.

No obstant això, donat que el desenvolupament tecnològic en l'àmbit dels suavitzants, del qual es deriva la millora de les propietats tèxtils, comporta risc de toxicitat, resulta fonamental el considerar la seva possible repercussió mediambiental.

Al 1993, al Laboratori de Toxicologia Ambiental del INTEXTER (UPC) vàrem iniciar treballs sobre la toxicitat d'alguns compostos utilitzats en els processos tèxtils. Els resultats obtinguts van impulsar la realització d'un estudi més complert sobre l'impacte ambiental d'aquests compostos, així com un seguiment del comportament dels productes tensioactius en condicions de laboratori (Lab. Tensioactius i Detergència de l'INTEXTER, UPC).

El tema de la present tesi doctoral inicià el seu desenvolupament amb relació al projecte DGICYT PB90-0607 (1991-1994) *Aplicació de les microemulsions de suavitzants tèxtils per a la millora de les propietats dels teixits* en el qual es pretenia valorar l'impacte ambiental resultant de l'aplicació de microemulsions de suavitzants catiónics, i ha tingut la seva continuïtat dins el projecte CICYT AMB 95-0408 (1995-1998) *Compuestos orgánicos halogenados adsorbibles, extraíbles y purgables en el blanqueo del algodón e incidencia medioambiental*. Es convenient remarcar el gran interès per part d'algunes empreses (KAO Corporation S.A. i Shering Rewo Química S.A.) en aquests estudis, que ens van proporcionar alguns dels seus productes, i van seguir molt de prop els nostres primers resultats. Aquests, podríem dir, van ajudar a definir l'objectiu general del treball que aquí es presenta, el qual s'inicià al 1993.

2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

2.1 OBJECTIUS

En l'actualitat existeixen una sèrie de Directives comunitàries encaminades totes elles a la preservació del medi ambient. Concretament, en algunes orientacions de la Unió Europea s'estableix la necessitat de fer valoracions de la toxicitat en diferents ecosistemes, és a dir, utilitzant diferents espècies d'animals d'experimentació o equivalents, per tal de determinar les concentracions capaces de produir efectes a la població exposada (concentracions efectives en un període de temps concret) de cara a poder avaluar el seu potencial tòxic.

Dels productes usats per la indústria tèxtil, els productes tensioactius constitueixen un grup molt important en nombre i en varietat, amb capacitat d'incidir en diferents compartiments ambientals, degut a la seva presència en els efluents residuals de diferents processos. Entre aquests productes es troben els suavitzants, i són els de tipus catiònic els més utilitzats.

Entre els suavitzants catiònics són de destacar els d'estructura química d'amoni quaternari i els d'imidazolina quaternària per la seva importància en la fabricació d'aquests productes. La forma d'aplicació d'aquests pot ser en emulsió i en microemulsió, diferenciant-se en la seva mida de partícula, i per tant en el seu poder de penetració en el teixit. Per a la fabricació de suavitzants microemulsionats s'utilitzen una sèrie de compostos microemulsionants que permeten l'obtenció de mides de partícula 100 vegades inferiors a les dels suavitzants convencionals (2 micres).

Els objectius principals del present treball han estat establir si hi ha diferències entre la forma emulsionada i microemulsionada d'una sèrie de suavitzants catiònics, pel que fa als seus possibles efectes en el medi aquàtic. Amb aquesta finalitat s'han estudiat els següents aspectes:

1. Paràmetres de degradació dels suavitzants catiònics d'amoni quaternari DSDMAC, DSEMAMS i DSCEEMAMS, i dels suavitzants catiònics d'imidazolina quaternàries DSAEMIMS i DAAIMS, tant en forma emulsionada com microemulsionada.

2. Toxicitat aguda dels suavitzants catiònics d'amoni quaternari DSDMAC, DSEMAMS i DSCEEMAMS, i d'imidazolina quaternària DSAEMIMS i DAAIMS, emulsionats i microemulsionats, en diverses espècies d'organismes aquàtics de diferents nivells tròfics, per tal d'establir la toxicitat del compost i la sensibilitat de cada espècie.

3. Efectes provocats en el tractament subcrònic amb un suavitzant d'amoni quaternari (DSDMAC) i un de imidazolina quaternària (DAAIMS) emulsionats i microemulsionats sobre la morfologia i ultraestructura de diferents òrgans (brànquia i fetge) de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*).

2.2. PLA DE TREBALL

S'ha dividit l'estudi en dos blocs de treball. Un primer en el que s'estudien els paràmetres de degradació dels suavitzants i la toxicitat aguda d'aquests en diferents espècies, i un segon en el qual es fa l'estudi histopatològic de brànquia i fetge de la truita irisada *Oncorhynchus mykiss* sotmesa a tractament subcrònic utilitzant dos dels suavitzants, un amoni quaternari i una imidazolina quaternària.

1.- Determinació de paràmetres de degradació ambiental dels suavitzants DSDMAC, DSEMAMS, DSCEEMAMS, DSAEMIMS i DAAIMS emulsionats i microemulsionats:

- Demanda química d'oxigen (DQO)
- Demanda biològica d'oxigen (DBO)
- Biodegradabilitat: — Biodegradació inherent
- Biodegradació ràpida

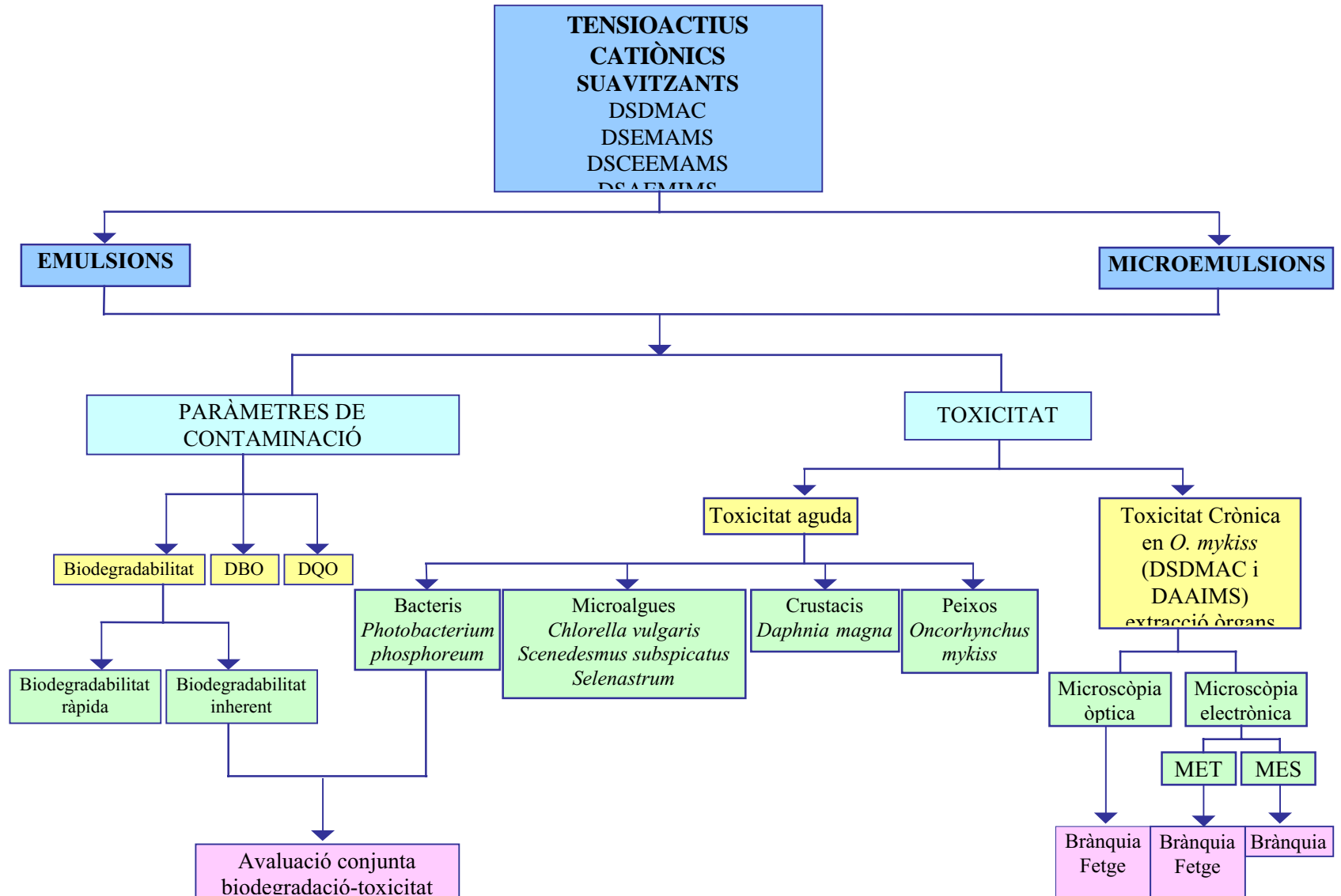
2.- Seguiment de la biodegradabilitat dels suavitzants conjuntament amb el de la seva toxicitat (Relació biodegradació-toxicitat).

3.- Determinació de la CE_{50} , CI_{50} i CL_{50} per diferents espècies de diferents nivells tròfics segons les directives establertes per cada una d'elles.

- Bacteris: *Photobacterium phosphoreum*
- Microalgues: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*,
Selenastrum capricornutum.
- Crustacis: *Daphnia magna*.
- Peixos: *Oncorhynchus mykiss*.

4.- Estudi de la morfologia normal i patològica de la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) sotmesa a tractament subcrònic amb els suavitzants DSDMAC i DAAIMS emulsionats i microemulsionats. En aquest estudi es van seguir els passos següents:

- Determinació de la concentració de tractament de cadascun dels suavitzants a partir de la CL_{50} .
- Microscòpia òptica: Estudi dels diferents òrgans (brànquia i fetge) en animals controls i tractats.
- Microscòpia electrònica de transmissió: Estudi dels òrgans esmentats a partir dels resultats obtinguts en microscòpia òptica.
- Microscòpia electrònica d'escombratge: Estudi de les brànquies.



3. CARACTERITZACIÓ I TOXICITAT AGUDA DELS SUAVITZANTS CATIÒNICS. EFECTES AMBIENTALS

3.1. INTRODUCCIÓ

3.1.1. TENSIOACTIUS

L'aigua és el solvent més utilitzat per la indústria tèxtil, amb el qual s'humitegen, es blanquegen, es tenyeixen i s'acaben altres processos que s'apliquen als teixits. Tanmateix, l'aigua té una tensió superficial relativament elevada, i és aquesta la força que manté i conserva intacte la forma de la gota sobre el teixit, i no permet que aquesta penetri en ell. Els tensioactius, que són utilitzats àmpliament en usos domèstics i industrials, són compostos que es caracteritzen per fer disminuir la tensió superficial de l'aigua i per la facilitat amb que són adsorbits per varies interfases, com per exemple, aire-aigua, oli-aigua, aigua-sòlid, oli-sòlid, etc. En anys recents, els sabons tradicionals per al rentat domèstic de la roba han estat reemplaçats per detergents que contenen tensioactius sintètics i altres ingredients que poden contenir suavitzants, blanquejadors i perfums (Pratt, 1980; Kratzel, 1989).

3.1.1.1. Estructura química i comportament

La forma més comuna dels agents tensioactius consisteix d'una cadena hidrocarbonada o apolar, i un cap iònic o polar (FIGURA 1). La cadena hidrocarbonada pot ser lineal o ramificada i és hidrofòbica, mentre que el cap polar és hidrofílic. (Infante, 1991)

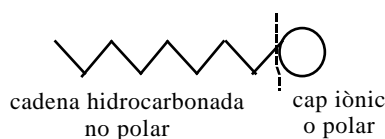


FIGURA 1: Estructura esquematitzada d'una molècula de tensioactiu

L'existència en la mateixa molècula de dues zones estructuralment diferents, una amb afinitat pel solvent (hidròfila o lipòfila, segons la naturalesa d'aquest) i una altra amb poca afinitat (hidròfoba o lipòfoba), constitueix una estructura amfipàtica o amfifílica. Aquesta naturalesa dual, i l'equilibri entre la part hidròfila i la part hidròfoba, és la característica estructural determinant i responsable dels fenòmens d'activitat superficial i d'agregació micel·lar dels

tensioactius (Ottewill, 1983; Infante, 1991).

La tensió superficial es pot definir com la tensió existent en la capa superficial d'un líquid i dirigida cap al seu interior, deguda a les interaccions entre les molècules situades a la superfície i les existents en el interior d'aquest i que tendeix a reduir al mínim la superfície de contacte líquid/aire (García-Domínguez, 1987)

La tensió superficial d'un líquid és més gran com més intensa és la força d'atracció entre les seves molècules (FIGURA 2). L'aigua, a causa dels enllaços d'hidrogen intermoleculars, presenta una força d'atracció molt considerable entre les seves molècules, i és per això que té una tensió superficial elevada (70 mN/m) en comparació a la majoria de compostos orgànics (20-30 mN/m).

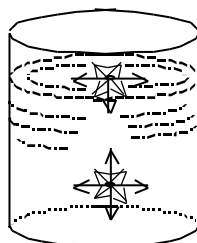


FIGURA 2: Esquematzació del fenomen de tensió superficial

En dissolvents com l'aigua, les molècules de tensioactiu es distribueixen de tal manera que la seva concentració en la interfase aigua/aire és major que en la regió interior de la solució, i per això queden orientades de tal manera que els seus grups polars queden dirigits cap a la fase polar, i els seus grups no polars o hidròfobs en queden allunyats (FIGURA 3). Aquesta peculiar adsorció de les molècules de tensioactiu en les interfases o superfícies que les contenen és deguda als factors següents (Garcia-Domínguez, 1987; Infante, 1991)):

- La dèbil interacció que hi ha entre la part hidròfoba d'un tensioactiu i les molècules d'aigua.
- La forta interacció (forces de dispersió o ponts d'hidrogen) que té lloc entre les molècules d'aigua amb si mateixes, que provoca l'expulsió de la part hidrocarbonada del tensioactiu del sinus aquós.
- La forta interacció entre la part iònica o polar del tensioactiu amb l'aigua a través d'enllaços ió-dipol o dipol-dipol, amb la qual cosa queda solvatada.

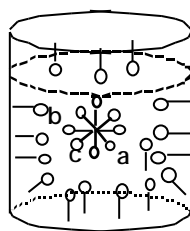


FIGURA 3: Disposició que poden adoptar les molècules de tensioactiu en dissolució aquosa. a) Monòmers de tensioactiu no associats; b) monòmers adsorbits i orientats en la interfície aire-líquid i sòlid-líquid; c) micel·la.

Com a resultat d'aquest antagonisme, les molècules de tensioactiu no queden separades completament en una altra fase, sinó que queden preferentment adsorbides en interfase amb la part hidròfoba fora del sinus de la fase aquosa, i la part hidròfila, sol·licitada. Aquest excés d'adsorció de molècules de tensioactiu en interfase aigua/aire provoca una disminució progressiva de la tensió superficial del solvent. Aquesta activitat superficial depèn fonamentalment de l'estructura del tensioactiu, de l'estructura del solvent i de la temperatura.

D'altra banda, per a evitar el contacte desfavorable entre la part hidròfoba del tensioactiu i el dissolvent, a part de l'adsorció, els tensioactius poden formar agregats moleculars, anomenats micel·les per McBain al 1913. A l'interior de la solució i a partir d'una concentració de tensioactiu anomenada concentració micel·lar crítica (CMC), té lloc la formació d'agregats moleculars de mida col·loidal, les micel·les, les quals estan en equilibri amb els monòmers adsorbits o en solució. Les micel·les poden considerar-se com a microestructures amb una marcada separació entre la part hidròfoba sol·licitada i orientada cap a la fase aquosa, i la part hidròfoba situada a l'interior de la micel·la (FIGURA 4) (Infante, 1991).

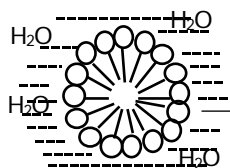


FIGURA.4: Esquema d'una micel·la

Una emulsió és una dispersió d'un líquid en un altre líquid. El líquid que es troba en forma de gotetes finament dividides s'anomena fase interna o fase dispersa. L'altre líquid que rodeja les gotetes disperses de manera ininterrompuda és la fase externa o contínua. En la majoria de les emulsions, una de les dues fases consisteix en aigua o una dissolució aquosa, que s'anomena fase aquosa (W); l'altra fase, que és immiscible amb la fase aquosa, s'anomena fase oliosa (O). A les

emulsions oli en aigua se les anomena O/W i a les aigua en oli W/O (Becher, 1972; García-Domínguez, 1987).

La fase dispersa d'una emulsió està formada per petites gotes amb diàmetres compresos entre 0,1 μm i 10 μm . Des del punt de vista termodinàmic, les emulsions són sistemes inestables. L'augment extraordinari de l'àrea interfàtica, produït quan un líquid es dispersa en un altre líquid, provoca un increment tal de l'energia lliure interfacial del sistema que la tendència de les gotes d'una emulsió és la de fusionar-se entre si i assolir la completa separació de fases, situació en què l'àrea interfacial és mínima i el sistema és estable (García-Domínguez, 1987).

Les microemulsions són sistemes col·loïdals, amb elevat contingut en fases aquosa i oliosa, que es caracteritzen per formar-se espontàniament, ser termodinàmicament estables i contenir partícules tan petites (aproximadament 10 nm) que la seva turbulència és baixa (García Domínguez, 1987). L'estabilitat de les microemulsions s'aconsegueix majoritàriament mitjançant la combinació d'un compost tensioactiu iònic i d'un cotensioactiu hidròfob (per exemple un alcohol de longitud de cadena mitjana) (Overbeek i de Bruyn, 1984; García-Domínguez, 1987).

3.1.1.2. Classificació general dels tensioactius

Existeixen uns 600 productes tensioactius de diferent estructura química. La major part de la producció de tensioactius està destinada a detergents i sabons; la resta, a la indústria de cosmètics, a l'agroalimentària, a la fabricació de pintures, lubricants, etc.

Les matèries primeres per a la síntesi industrial dels tensioactius s'obtenen fonamentalment a partir de greixos i olis naturals, lignina i oli de la polpa de la fusta, i derivats del carbó i del petroli.

Els tensioactius no són substàncies uniformes i homogènies, sinó barreges polidisperses definides com a preparats que contenen molècules homogènies en els què pot variar algun detall estructural. Els tensioactius generalment es classifiquen atenint-se a la naturalesa del grup hidròfil o polar de la molècula, i se'n poden distingir quatre grans grups:

— aniónics: compostos que tenen un o varis grups funcionals que s'ionitzen en dissolucions aquoses originant ions orgànics amb càrrega negativa i responsables de l'activitat superficial

— catiónics: compostos químics amb un o varis grups funcionals que s'ionitzen en dissolució aquosa, originant ions orgànics carregats positivament i responsables de l'activitat superficial.

— no iònics: compostos que en dissolució aquosa no originen ions. La seva solubilitat en aigua es deu a la presència en la seva molècula de grups funcionals amb una elevada afinitat per a l'aigua.

— amfòters: presenten en la seva estructura molecular un o més grups funcionals que poden ionitzar-se en dissolució aquosa, conferint al compost el caràcter de tensioactiu aniònic o catiònic, segons les condicions del medi.

No hi ha diferències tan acusades respecte a la naturalesa dels grups hidròfobs. Normalment són cadenes llargues d'hidrocarburs, encara que també poden ser cadenes fluocarbonades i de silicones. Entre els diferents residus hidròfobs es poden incloure els següents:

- grups alquílics de cadena llarga simple o ramificada ($C_8 - C_{20}$)
- grups alquilbenzè de cadena llarga ($C_8 - C_{15}$)
- polímers d'òxid de propilè d'alt pes molecular
- cadenes fluocarbonades llargues
- grups polisiliconats

3.1.2. TENSIOACTIUS CATIÒNICS

Els tensioactius catiònics es refereixen a aquells compostos que contenen al menys una cadena llarga hidròfoba de $C_8 - C_{22}$ àtoms de carboni (R), normalment derivada d'àcids grassos o fonts petroquímiques, i una part hidròfila, que pot ser un nitrogen, un fòsfor o un sofre, carregada positivament, i els que porten nitrogen en són els més importants (Infante, 1991).

El grup R pot estar unit directament a l'àtom de nitrogen, i aquest pot formar part d'un anell heterocíclic, com en el cas de les sals d'imidazolina.

Els tensioactius catiònics tenen tendència a adsorbir-se fortament sobre les superfícies sòlides (la majoria de les quals estan carregades negativament) i poden conferir determinades característiques a aquells substrats en què s'adsorbeixen. D'aquest fet deriven la majoria de les seves propietats (TAULA I).

TAULA I: Algunes utilitzacions dels tensioactius catiónics a partir de la seva adsorció en substrats sòlids (Schwitzer, 1972).

Substrat	Utilització
Fibres naturals o sintètiques	suavitants antiestàtics auxiliars tèxtils
Fertilitzants	agents antienganxants
Males herbes	herbicides
Agregats	agents d'adhesió en asfalt
Metalls	inhibidors de la corrosió
Pigments	dispersants
Plàstics	antiestàtics
Pell, queratina	cosmètica
Minerals	agents de flotació
Microorganismes	germicides

S'utilitzen àmpliament en medi aquós (àcid) i en sistemes no aquosos; generalment es fan servir com a suavitzants tèxtils, estabilitzants d'escuma i inhibidors de la corrosió. Moltes sals d'amoni quaternari tenen activitat germicida, fungicida i alguicida.

Els tensioactius catiónics són utilitzats extensivament en la indústria tèxtil com a auxiliars de procés per a augmentar la suavitat al tacte, reduir l'electricitat estàtica, millorar la uniformitat en la tintura, millorar la fermesa de rentat de tintura directe i proporcionar repel·lència a l'aigua als teixits (Jungermann, 1970; Carrión, 1988; Jang i Yeh, 1993; Ali i Begum, 1994).

La majoria dels tensioactius catiónics són compostos de nitrogen quaternari, els quals normalment són sals lleugerament àcides en què l'anió és un clorur o sulfat. Si bé aquests són amines grasses de cadena llarga, també hi ha altres tipus de quaternaris que són utilitzats, com són les imidazolines, les amines de polietilè i resines de dicianodiamida, les amides grasses i alcanolamides, el clorur d'amoni trimetil benzil, els heterocíclics (com la piridina, la piperazina, la piperidina) i certes amines grasses etoxilades.

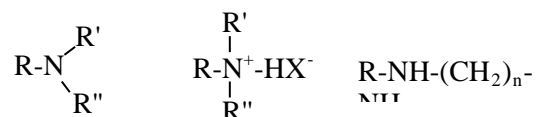
3.1.2.1. Classificació dels tensioactius catiónics

3.1.2.1.1. Amines grasses i les seves sals

Estan constituïdes principalment per amines primàries, secundàries o terciàries, derivades d'àcids greixosos naturals, així com per amines sintètiques primàries de 12-18 àtoms de carboni.

Són productes molt solubles i estables en dissolucions fortament àcides, encara que molt sensibles als canvis de pH.

S'utilitzen com agents emulsionants a valors de pH inferiors a 7; poden actuar, tanmateix, com inhibidors de corrosió de superfícies metàl·liques; en la flotació de minerals, faciliten la separació de la mena.

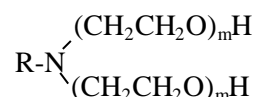


R representa una cadena hidrocarbonada de fins a C₈ àtoms de C.

R' i R'' poden ser grups alquil, aril o hidrogen.

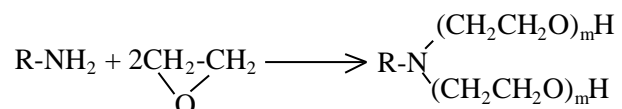
X representa un anió.

3.1.2.1.2. Amines grasses etoxilades



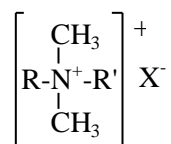
L'etoxilació és un procediment econòmic per a obtenir una gran varietat de propietats addicionals en els tensioactius catiònics.

El caràcter catiònic es perd progressivament en augmentar la longitud de les cadenes etoxilades i s'afavoreix un comportament no iònic. Les amines grasses etoxilades deriven fonamentalment d'alquils amines primàries lineals. A pesar de la varietat d'estructures químiques possibles, les amines etoxilades s'assemblen entre si quant a les seves propietats.



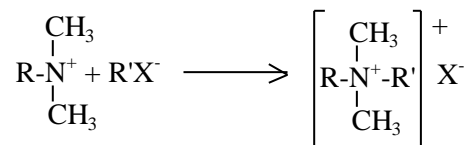
S'utilitzen com agents antielectrostàtics en la indústria tèxtil, així com a retardadors en tintura i com inhibidors de corrosió de superfície metàl·liques.

3.1.2.1.3. Sals d'amoni quaternari



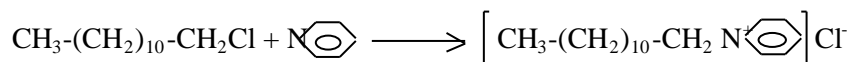
En general estan constituïdes per clorurs o bromurs d'N-alquil trimetil amoni o d'NN'-dialquil dimetil amoni. L'ió amoni quaternari és un grup hidròfil molt més fort que qualsevol grup amí.

Es preparen per reacció de l'amina terciària corresponent amb un agent quaternitzant. Encara que els mètodes de producció varien considerablement, els amoni quaternaris es preparen per reacció d'una amina terciària amb un agent alquilant.



Els agents alquilants que s'utilitzen més sovint són el clorur de metil, el clorur de benzil i el metil sulfat.

També es poden preparar per una exhaustiva alquilació d'una amina grassa primària o secundària, o per alquilació d'una amina terciària de baix pes molecular (trimetil amina, trietil amina i piridina) amb un halur d'alquil.

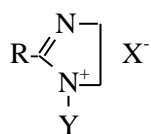


La major producció de compostos d'amoni quaternari s'obtenen a partir de la metilació total d'una amina grassa primària o secundària en medi aquós o aquós i alcohòlic alcalí, i a una temperatura de 80-100 °C sota una pressió moderada.

S'utilitzen aquests productes com suavitzants en tèxtil i en cosmètica, i resulten molt eficaços com a germicides.

3.1.2.1.4. Imidazolines quaternàries

Les imidazolines són substàncies que tenen un anell de cinc termes amb l'estructura següent:



R: representa un grup alquil provinent d'un àcid gras, d'un metil estearat o d'altres greixos;

Y: pot representar un dels grups següents

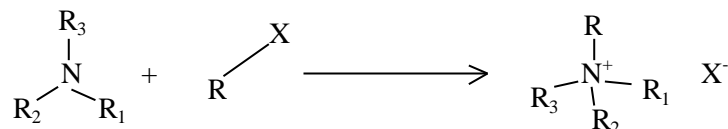
- CH₂-CH₂-NH₂
- CH₂-CH₂-OH
- CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-NH₂

Segons els seus constituents es poden diferenciar dos grans grups:

- etoxilades,
- quaternitzades per monoclorur de benzil, dimetilsulfat i altres halurs d'alquil.

3.1.2.2. Mètodes de producció de tensioactius catiónics

Encara que els mètodes de producció varien considerablement, els compostos d'amoni quaternari normalment es preparen fent reaccionar una amina terciària amb un agent alquilant (Boethling i Lynch, 1992):



Els agents alquilants més comuns inclouen: metil clorur, dimetil sulfat, dietil sulfat i benzil clorur.

Com a exemple de síntesi es podria esquematitzar la del clorur de dialquildimetilamoni (DSDMAC), un dels suavitzants utilitzats en el present estudi. En primer lloc es produeix la reacció d'un àcid gras amb l'amoníac (FIGURA 5A) amb despreniment d'aigua amb la qual s'obtindria un nitril. Posteriorment, a través d'una reacció catalítica (FIGURA 5B), el nitril es transformarà en una amina dialquífica, la qual amb un agent alquilant es quaternitza, i s'obté l'amoni quaternari (FIGURA 5C) (Täuber i May, 1982).

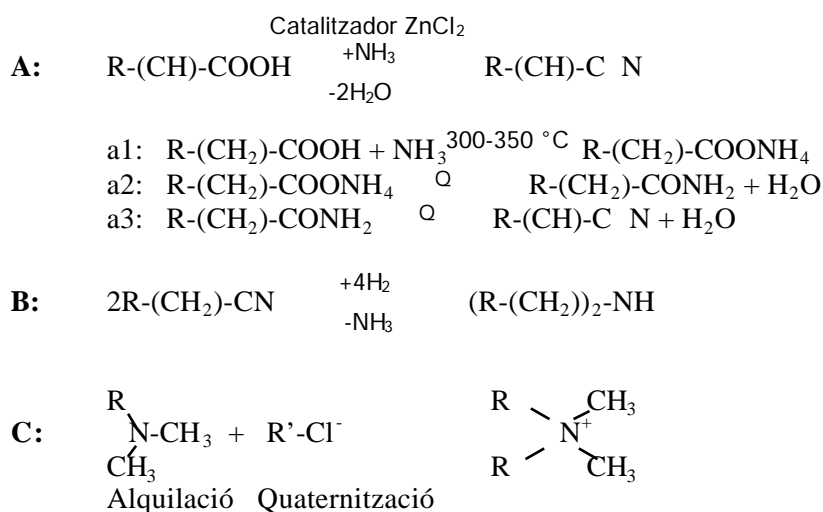


FIGURA 5: Esquema de la síntesi de tensioactius catiónics

Fins al desenvolupament dels tensioactius petroquímics, els olis vegetals i els greixos animals eren les úniques matèries primeres utilitzades per a la seva síntesi. Tots els tensioactius catiónics es poden considerar derivats d'amines grasses, les quals presenten una, dues o tres cadenes alquíliques llargues unides directament o indirectament a l'àtom de nitrogen catiónic.

En els tensioactius catiónics comercials la cadena alquíllica llarga (R) normalment està formada per una barreja d'homòlegs. Quan el grup alquil s'obté d'àcids grassos derivats d'una font natural com el sèu o l'oli de cacauet, R no solament varia en la seva longitud sinó també en el seu nivell de saturació. Quan R deriva de fonts petroquímiques es pot trobar un gran nombre de derivats a causa de les variacions en el pes molecular, el nivell de ramificació, la presència d'impureses cícliques o les diferències en els substituents dels anells en els sistemes cíclics.

A escala industrial els compostos d'amoni quaternari són sintetitzats en reactors de vidre o d'acer. L'amina terciària i el solvent (per exemple, isopropanol i/o aigua) són carregats al reactor on seran escalfats fins a arribar a una temperatura de 80-100 °C; posteriorment s'hi afegeix l'agent alquilant. L'excés d'aquest últim és eliminat per evaporació, i el producte és purificat en un o més passos per a eliminar restes o subproductes que s'hagin pogut produir. No obstant això, els amoni quaternaris són difícils de separar i purificar, per la qual cosa la seva producció en forma sòlida és inviable, i normalment estan disponibles com a solucions o dispersions en medi aquós o alcohols alifàtics.

Un mètode patentat per Hardy (1980) permet la formulació dels amoni quaternaris com dispersions finament dividides o en solució en un medi orgànic, amb la qual cosa s'ofereixen uns mètodes de producció fàcils i econòmics.

3.1.2.3. Comportament físico-químic

La propietat més important dels tensioactius catiónics des d'una perspectiva mediambiental és que són fortament adsorbits per una gran varietat de materials carregats negativament. No solament tenen una alta afinitat per certs tipus de teixits (cotó, fibres de cel·lulosa), sinó també per a superfícies minerals i biològiques. Són adsorbits fortament tant per sediments naturals com per fangs residuals i fangs activats. Larson i Vashon (1983) van trobar que l'adsorció tenia lloc ràpidament, amb la qual cosa s'aconseguia l'equilibri al cap de poques hores; d'altra banda, van trobar que les constants d'equilibri per a l'adsorció en fangs era més alta en amoni quaternaris monoalquils que en els dialquils, a pesar de la menor solubilitat en l'aigua d'aquests últims. Això suggereix que l'adsorció dels amoni quaternaris a sediments implica quelcom més que una simple dependència de la seva mida o de la seva solubilitat, en les quals les variables principals són la hidrofobicitat i el contingut de carboni orgànic del solut i de l'adsorbent respectivament (Boethling i Lynch, 1992).

Els cations orgànics, com poden ser els amoni quaternaris semblen ser adsorbits per llocs minerals, principalment per atracció electrostàtica. Amb els llocs minerals de tipus montmoril lonita, caolinita o il lita no solament hi ha una unió amb la superfície externa d'aquests, sinó també una inclusió en l'enreixat laminar intern. Els tensioactius incorporats en

aquest enreixat intern no són tan accessibles a un atac biològic per bacteris (Huber, 1984). S'ha observat el poc efecte de la caolinita en la biodegradació de compostos d'amoni quaternari en contrast de l'efecte inhibitori de la montmoril·lonita, a causa del gran enreixat intern que constitueix aquesta última. D'aquesta manera els cations orgànics aparentment estan protegits d'un atac microbià per l'adsorció en les superfícies internes d'aquest tipus de llot (Boethling i Lynch, 1992).

Altres estudis indiquen que els amoni quaternaris també són ràpidament adsorbits per una gran varietat de materials. A part dels fangs activats, sediments i llots, també s'adhereixen a minerals, incloent-hi halurs, sulfurs, òxids, sulfats, proteïnes, i parets cel·lulars de microorganismes (Ginn, 1970a, 1970b; Swisher, 1987).

Una característica relacionada amb els compostos d'amoni quaternari és que formen complexos 1:1 amb materials aniònics, especialment tensioactius aniònics. Aquests complexos són relativament hidròfobs, encara que presenten un gran caràcter iònic. Es poden trobar en aigües superficials i en aigües residuals domèstiques, ja que els tensioactius aniònics són produïts i alliberats al medi ambient en major quantitat que els tensioactius catiònics. Això fa que aquests últims, en mostres mediambientals, siguin difícils de detectar per mètodes analítics i que els resultats que s'han obtingut siguin poc reals (Boethling i Lynch, 1992).

La capacitat dels tensioactius catiònics per a unir-se a materials carregats negativament també sembla afectar l'adsorció dels metalls pesats amb els quals entren en competició en processos de tractament biològic. Se sap que els fangs activats tenen una gran capacitat d'eliminar metalls pesants. Huber (1982) va demostrar que la seva adsorció es veia impossibilitada considerablement en presència de tensioactius catiònics.

El comportament dels tensioactius catiònics en el medi ambient també es veu afectat per la seva estabilitat fotoquímica. La llum ultraviolada d'ona curta origina una forta oxidació total o parcial després d'un període d'inducció de 16-72 hores. Després d'un curt temps d'exposició, els productes residuals són biodegradables. La detecció de la inestabilitat fotoquímica és particularment important quan es fa una avaluació agrícola dels fangs residuals que contenen tensioactius catiònics, ja que han patit una llarga exposició a la llum (Huber, 1984).

3.1.2.4. Propietats i aplicacions

Els tensioactius catiònics, així com els aniònics, no iònics i amfotèrics, fan disminuir la tensió superficial de l'aigua, formen micelles, i alguns fan una bona escuma. No obstant això, posseeixen una capacitat de rentat petita, que es pot millorar si es barreja amb altres tipus de tensioactius.

D'altra banda, els tensioactius catiònics tenen com a característica la seva afinitat per a tota

classe de superfícies, normalment carregades negativament, amb la qual cosa es presenta el fenomen de la quimiosorció, en el qual els cations actius formen una mena de sals insolubles amb les partícules carregades negativament de la superfície (Täuber i May, 1982; Boethling i Lynch, 1992).

Gràcies a aquest fenomen de quimiosorció s'originen les propietats i aplicacions més importants dels tensioactius catiónics (Täuber i May, 1982):

- Efectes antiestàtics
- Precipitació d'albúmines
- Desinfecció
- Anticorrosió
- Hidrofobització

La major part de la producció dels tensioactius catiónics va destinada a la fabricació de suavitzants, els quals proporcionen efectes antiestàtics als teixits de fibra sintètica i natural, i que acumulen electricitat estàtica en ser confeccionats.

Les albúmines presenten un gran nombre de grups carboxílics lliures. Amb aquests centres aniònics s'uneixen els tensioactius catiónics en una reacció d'intercanvi iònic, que porta a la precipitació de les proteïnes de les albúmines solubles. Aquest efecte té una aplicació pràctica en la fabricació de determinats antibiòtics que al final del procés de fermentació s'han d'extreure d'una solució rica en albúmines amb dissolvents i purificar-los.

Uns efectes semblants són la base de la seva utilització en la desinfecció, ja que causa la destrucció de microorganismes. No obstant això, solament les substàncies amb cadenes alquíliques molt curtes tenen aquest efecte.

A causa que els tensioactius catiónics formen capes monomoleculares sobre els metalls, que permeten l'adhesió de pel·lícules d'oli, es poden emprar com a anticorrosius per a diferents metalls. També es poden utilitzar com a repel·lent d'aigua, i proporcionar un efecte hidrofobitzador a les superfícies pètries, útil en la construcció de carreteres i camins.

La indústria cosmètica també utilitza tensioactius catiónics en la fabricació de cremes i productes capil·lars per a després del rentat.

La indústria tèxtil utilitza una gran quantitat d'aquest tipus de tensioactius, entre els quals destaca en primer lloc la fabricació de suavitzants, però també s'utilitzen com a auxiliars de procés, i en la tintura de teixits.

3.1.3. SUAVITZANTS

En la indústria tèxtil de tots els tensioactius catiònics, probablement els suavitzants són els més utilitzats.

La suavització ja era practicada comunament en temps antics. A l'edat mitjana, ja s'utilitzaven productes de naturalesa semblant a la del sabó, preparats a partir de la cendra de fusta i el sèu, com la brillantina.

Quan el comerç tèxtil, fa 150 anys, va entrar en l'àmbit industrial, el sabó era l'únic auxiliar disponible. En el segon terç del segle XIX, al sabó de Marsella s'hi va afegir oli de roig turc, el qual es podia considerar un veritable suavitzant, ja que li mancaven els efectes de neteja del sabó i proporcionava suavitat als teixits.

L'aparició de *Monopalseife* (sabó) (1896) va comportar un desenvolupament en la recerca i en el treball en aquest sector, fins arribar a l'actualitat en que els teixits poden ser suavitzats amb components aniònics, no iònics, amfòters i catiònics, com també amb emulsions de parafina, cera, polietilè, poliuretà i silicona. Als anys cinquanta i seixanta un grup de productes van entrar amb força en el sector de la detergència i els agents de neteja. A aquests productes se'ls va anomenar suavitzants, i eliminaven el tacte aspre produït pels processos de rentat moderns. Els suavitzants donen a la roba neta un tacte suau i agradable.

Els suavitzants, no obstant això, no solament proporcionen suavitat al teixit, sinó que també presenten altres propietats (Carrión, 1988; Berenbold, 1990; Puchta i altres, 1993):

- impedeixen l'acumulació de càrregues electrostàtiques,
- proporcionen elasticitat a les fibres,
- faciliten la planxada,
- redueixen el temps d'assecatment,
- donen una fragància agradable al rentat, i
- allarguen la vida útil dels teixits al reduir el desgast pel frec mecànic.

Les fibres passen a través de múltiples processos d'acabat, en el curs dels quals són eliminats la major part de les grasses, les ceres i els agents de processat existents en els teixits. Els agents suavitzants compensen la fragilitat resultant i contribueixen a reduir la càrrega electrostàtica.

El tractament de suavització proporcionarà als teixits el tacte volgut, donant-los una aparença agradable, facilitant-ne el processament i millorant-ne les propietats en la seva utilització en el vestir.

En la TAULA II s'especifiquen les propietats que presenten aquest grup de productes:

TAULA II: Requeriments dels suavitzants (Hardt, 1990)

Propietats dels suavitzants:	Factors que cal tenir en compte en la seva utilització:
<ul style="list-style-type: none"> — <u>Tèxtils:</u> tacte, volum, suavitat, olor, caiguda — <u>Mecàniques:</u> elongació, elasticitat, resistència a torçar-se resistència al trencament, resistència a la tensió, llisor, tendència a formar pelussa — <u>Funcionals:</u> balanç d'humitat (hidròfil i hidròfob), naturalesa antiestàtica, retard a flama, repel·lència al sol, costura, prevenció de la formació d'arrugues, propietats antimicrobianes - <u>Estètiques:</u> matís de color, fermesa, permanència, blancor, termomigració 	<ul style="list-style-type: none"> — <u>Compatibilitat ambiental (producció i utilització):</u> degradabilitat biològica, toxicitat, potencial d'irritació, corrosivitat, esgotament de bany, restriccions de transport i emmagatzemament — <u>Resistències a:</u> electròlits, àcids, àlcalis,

Els suavitzants catiónics són compostos que pertanyen bàsicament a tres grups: imidazolines, amines grasses i amides grasses. Les imidazolines grasses poden tenir una amida grassa penjant del grup etil beta-amino, o pot ser un acetat o un alquil quaternari de la imidazolina principal amb una part etil beta-hidroxi penjant. Les amines quaternàries grasses són una mica menys costoses des del punt de vista econòmic però no donen la mateixa qualitat de tacte que les imidazolines. La longitud de les cadenes de carboni de les amines quaternàries grasses normalment es troba entre C_{12} i C_{22} .

La utilització de compostos quaternaris per a la fabricació de suavitzants es va desenvolupar a partir de les observacions de tacte sedós que proporcionaven al gènere rentat amb aquests. Mentre que els compostos quaternaris són auxiliars de rentat molt deficients, a causa del caràcter aniònic de molts gèneres, s'ha observat que donen una gran suavitat al tacte malgrat que el rentat no sigui bo.

Els suavitzants normalment estan disponibles en tres formes: els que s'incorporen en el cicle d'esbandida, els que s'incorporen en sec impregnant el gènere no teixit, o els que s'afegeixen en el cicle de rentat, els quals estan formats per una combinació de detergent, suavitzant i agent antiestàtic. Els suavitzants del cicle de rentat i d'esbandida normalment són amonis quaternaris líquids de clorur d'amoni de cadenes alquíliques de C_{16} - C_{18} , incloent-hi sals de diestearildimetilamoni i de dialquilimidazolina. Els suavitzants de cicle d'assecamment es formulen utilitzant un anió no corrosiu, com el metil sulfat.

Com a suavitzants són utilitzats un gran nombre de tensioactius pertanyents als diferents tipus. Presenten una àmplia varietat d'estructures químiques i cada un proporciona unes

propietats i característiques diferents (TAULA III):

TAULA III : Tipus de compostos suavitzants i les seves propietats (Hardt, 1990)

Tipus de compost	Manifestacions					
	suavitat	llisor	agrogament	escumació	afinitat	hidrofilitat
aniònic greixos sulfatats, olis, grups sulfonats que contenen àcids grassos condensats	-	+	+	-	-	+
no iònic productes d'oxietilació d'àcids grassos, alcohols, amines, amides	-	-	+	-	+	+
catiònic sals o amonis quaternitzats d'amines, aminoèsters i amino-amides terciàries	+	-	-	+	+	-
amfòter betaines amfòteres, òxid d'amines	+	-	-	-	+	+
Dispersió de greixos, olis, ceres, parafines, polietilè, silicones, poliuretans	-	+	-	+	+	-

+ = eficaç
- = no eficaç

TAULA IV: Importància econòmica dels suavitzants (segons Puchta i altres, 1993)

PAIS	Volum de mercat		Consum per càpita (kg) 1991
	Quantitat (Tt) 1991	Volum (milions de DM) 1991	
Àustria	16	40	6,0
Bèlgica	44	90	9,2
Alemanya	132	380	5,3
Espanya	239	360	8,3
França	142	380	5,7
Gran Bretanya	194	420	6,4
Itàlia	91	260	2,5
Països Baixos	33	70	4,6
Europa	891	2000	6,0

El volum econòmic del mercat de suavitzants a Europa representa 2.000 milions de marcs alemanys. Tanmateix, la situació varia molt segons els països. Gran Bretanya, França, Espanya i Alemanya són de gran importància en termes de volum de mercat absolut i consum per càpita (TAULA IV) (Puchta i altres 1993).

Donat que els suavitzants representen el segon mercat més gran dins el món de la detergència,

resulta essencial estimar el perill potencial mediambiental que comporta la seva producció i la seva utilització posterior.

A causa d'aquesta inquietud hi ha hagut països, com Alemanya, un dels principals consumidors d'aquest tipus de producte, on el consum ha decaïgut considerablement com a resultat de campanyes basades en arguments mediambientals.

Al voltant del 80 % de les matèries primeres utilitzades per a la fabricació de suavitzants s'han basat en el clorur dialquildimetilamoni (DTDMAC). No obstant això, el seu ús s'ha qüestionat degut a la pobra biodegradabilitat d'aquests compostos en les plantes de tractament de residus i a la seva alta toxicitat (Puchta i altres, 1993).

La tasca de trobar un substitut adequat al DTDMAC i desenvolupar a la vegada un suavitzant basat en aquest va ser difícil a causa que la nova matèria primera no solament havia de ser adequada ecològicament sinó que les seves propietats, efectivitat i fàcil formulació, havien de ser al menys equivalents a les del DTDMAC.

S'han trobat substàncies compatibles ecològicament, en compostos amb una estructura d'amoni o d'imidazolina, amb llargs radicals alquils els quals s'uneixen al centre de la molècula per enllaços éster.

En el moment d'avaluar l'impacte ecològic dels suavitzants (TAULA V) s'ha de considerar una gran gamma de factors individuals relacionats amb el medi ambient.

La legislació actual regula la producció, distribució i utilització per protegir tant la població com el medi ambient.

TAULA V: Factors a tenir en compte a l'avaluar els suavitzants (Hardt, 1990)

<ul style="list-style-type: none"> — Propietats fisico-químiques: <ul style="list-style-type: none"> — Solubilitat en aigua — Corba de pressió de vapor — Coeficient de partició (oli/aigua) — Hidròlisi — Viscositat — Densitat — Formació de metabòlits — Efectes en biosistemes: <ul style="list-style-type: none"> — Creixement algal — Toxicitat en peixos — Reproducció — Efectes en la fertilitat — Degradació i acumulació: <ul style="list-style-type: none"> — <i>Screening tests</i> per a biodegradabilitat 	<ul style="list-style-type: none"> — <i>Extended tests</i> per a biodegradabilitat <ul style="list-style-type: none"> — Fangs activats — Sòl — Tests en peixos — Efectes en la salut: <ul style="list-style-type: none"> a) Toxicologia a curt termini: <ul style="list-style-type: none"> — Toxicitats agudes — Toxicitats aquàtiques — Irritació cutània, irritació ocular — Sensibilització cutània — Toxicitats subcròniques — Teratogeneïtat b) Toxicologia a llarg termini: <ul style="list-style-type: none"> — Cancerogen — Toxicitat crònica, etc.
---	--

3.1.3.1. Risc ambiental dels suavitzants nitrogenats

3.1.3.1.1. Producció de matèries primeres

Greixos, àcids grassos, alcohols grassos, amines grasses

Aquests productes han estat fabricats a una escala industrial durant dècades, i han resultat ser un petit risc per al medi ambient si són aplicades les mesures de seguretat i les normes d'higiene adequades durant la manipulació.

Toxicitats orals: àcid esteàric: 10.000 mg/kg
 estearilalcohol: 2.000 mg/kg
 estearilamina: 2.000 mg/kg
 oleilamina: 200-2.000 mg/kg

Factors de risc: Irritant, càustic

Risc potencial: Baix

Alquilamines inferiors

A causa de les seves propietats bàsiques, volatilitat alta, olors intenses (adob d'arengada), risc latent de formació de nitrosamines, són essencials les mesures de seguretat pel que fa a emmagatzematge, transport, processament, producció i distribució.

S'ha de donar una atenció particular al risc de formació de nitrosamines per part d'amines secundàries amb gasos nitrosos, ja que aquestes han estat reconegudes com a altament carcinogèniques per a moltes espècies animals.

El contingut de certes nitrosamines (ex.: R = HO-CH₂-CH₂-) ha estat regulat d'acord amb la legislació de substàncies perilloses (GefstoffV) i és obligatori declarar-ne el contingut si aquest és superior a 5 ppm.

Factors de risc: Toxicitat
 Cancerogen (latent)
 Males olors, càustic, irritant
 Explosiu, combustible

Risc potencial: Moderat

Agents alquilants

Els agents alquilants necessaris per a la producció de catiònics d'amoni quaternari comporten un gran nombre de factors de risc, per això el seu processament solament pot ser permès si s'observen condicions estrictes.

Factors de risc: Cancergen
 Toxicitat
 Absorció cutània, sensibilitat

Mutagen
 Explosiu, combustible
 Càustic, irritant
 Risc potencial: Alt

TAULA VI: Agents alquilants (Hardt, 1990)

Agents alquilants	Fórmula	Concentració màxima permesa			Grup carcinogènic	Toxicitat
		ml/m ³	mg/m ³	H:S		
Metilclorur	CH ₃ -Cl	50	105		III B	LC ₂₀ 3146 ppm/7h
Metilbromur	CH ₃ -Br	5	20	H	III B	LD ₅₀ inhal 3120 ppm/0,5 kg
Benzilclorur	-CH ₂ -Cl	1	5		III B	oral LD ₅₀ 440 mg/kg inhal LC ₅₀ 150 ppm
Epiclorhidrina	CH ₂ CHCH ₂ Cl O	3	12	H	III A	LD ₅₀ 90 mg/kg
Dimetilsulfat	(CH ₃) ₂ -SO ₄	0,04	0,2	H	III A	LD ₂₀ 97 ppm/10 min
Dietilsulfat	(C ₂ H ₅) ₂ SO ₄	0,03	0,2		III A	inhal LD ₅₀ 250 ppm/ 4 h
Òxid etilè	CH ₂ -CH ₂ O	1	2	H	III A	LD ₅₀ 72 mg/kg
Ac. cloroacètic	Cl-CH ₂ COOH					LD ₅₀ 5 mg/kg

III: efectiu per absorció després de 2 h

H: absorció cutània
 S: sensibilitat

A: animal
 B: sospitosa

3.1.3.1.2. Producció de productes finals. Utilització de productes. Sals d'amines grasses

Els perills potencials durant la producció i la utilització poden ser mantinguts tolerablement baixos per l'elecció de components d'amina adequats i de mètodes específics de condensació. Molts compostos representatius d'aquest grup són de toxicitat baixa i s'aproximen a les taxes de degradació requerides.

Avaluació del risc: De baix a moderat

Amonis quaternaris

Els amonis quaternaris tenen una toxicitat alta en peixos, la qual augmenta en incrementar la solubilitat en l'aigua. Paral·lelament amb això, la velocitat de degradació també augmenta. Una taxa de degradació més elevada comporta la utilització de substàncies que són més tòxiques.

La toxicitat per als organismes aquàtics està basada en el bloqueig de la respiració branquial a causa de les propietats de superfície activa, en combinació amb una marcada tendència a l'absorció.

La posició dominant de l'amoni quaternari en el camp dels suavitzants rau en la combinació de diverses propietats: una bona solubilitat en aigua (emulsibilitat), la seva facilitat per ser adsorbit en superfícies, la seva acció antimicrobiana i la facilitat amb que és eliminat en aigües residuals.

3.1.4. EFECTES DELS TENSOACTIUS EN EL MEDI AMBIENT

Quan una substància química tòxica es distribueix en el medi ambient, pot ser que ho faci en un o més dels tres compartiments: aire, sòl i/o aigua. Si el producte és absorbit o incorporat per un organisme viu, aquest es pot transmetre a través de la xarxa alimentària a d'altres espècies fins que, eventualment, podria arribar a la població humana.

La destinació final d'una gran majoria de residus químics és l'ecosistema aquàtic i, per tant, la contaminació aquàtica té el seu origen en fonts diverses. Les fonts més comunes són aquelles aigües residuals procedents d'indústries o d'origen urbà, les quals són abocades al medi aquàtic sense cap tipus de tractament previ. D'altres fonts són tant la percolació d'abocadors de residus sòlids (industrials o urbans), les aigües sobrants de rec de terrenys agrícoles, moltes vegades saturades de productes agroquímics, i també les aigües superficials contaminades amb productes químics derivats d'activitats mineres i petroquímiques.

Actualment, la consciència ciutadana comença a assumir la importància de la preservació del medi ambient, i particularment la del medi aquàtic. Així mateix, han entrat en vigor noves mesures reguladores, nacionals i internacionals, que fan referència tant als tipus de residus abocats per les empreses, com al compost químic per ell mateix. Qualsevol estudi enfocat a conèixer els efectes ecològics d'un compost químic no ha de tenir en compte únicament la seva innocuïtat, sinó que també ha de valorar el risc ecològic potencial que implica la seva presència en el medi aquàtic (Lerda i Prospero, 1996; Guhl, 1999; Vandepitte i Feijtel, 2000).

Amb referència als tensioactius, a causa del gran volum de producció i a la seva àmplia utilització, la indústria de detergència es va interessar pels problemes sanitaris i mediambientals des dels anys 60. A conseqüència de les grans produccions dels anys 50 del TPBS (tetra propilè benzè sulfonat), producte sintètic utilitzat com a substitut del sabó, els rius van començar a cobrir-se de grans capes d'escuma; aquest problema es va agreujar per la reducció de l'oxigenació de les aigües superficials. Al 1964 la indústria química va reemplaçar el TPBS per un alquilbenzè sulfonat lineal (LAS). Al 1968, el Consell d'Europa va arribar a un acord parcial en la restricció de la utilització de certs tensioactius, i al 1971, l'Organització per a la Cooperació i Desenvolupament Econòmic (OCDE) publicà una guia específica de la biodegradació dels tensioactius (Blok i Balk, 1995).

Els danys que ocasionen els tensioactius per la seva presència a l'aigua són:

- formació d'escumes que paralitzen els processos de depuració natural o artificial, concentren les impureses i poden disseminar els bacteris i virus;
- disminució de l'absorció d'oxigen de l'atmosfera i la seva dissolució, fins i tot en absència d'escuma, per la formació d'una pel lícida aïllant que apareix a la superfície;

- augment del contingut de fosfats, procedent dels polifosfats combinats amb els tensioactius, que afavoreixen l'eutrofització dels llacs i l'augment de plàncton en els rius, i
- augment progressiu del contingut de bor en les aigües freàtiques procedents de les grans quantitats de perborat sòdic utilitzades en els detergents.

Abans de prendre una decisió sobre l'acceptabilitat o no d'un compost químic s'ha de valorar si representa un risc per al compartiment ambiental receptor. En aquesta valoració es determina l'anomenat "marge de seguretat", el qual ve donat per la concentració probable més elevada del compost en l'entorn ambiental (PEC: *Potential Environmental Concentration*), així com per la concentració mínima a la qual poden aparèixer efectes adversos (MAEC: *Minimum Adverse Effect Concentration*) (Larson i Woltering, 1995; Guhl, 1999; Vandepitte i Feijtel, 2000).

PEC > MAEC	compost inacceptable
MAEC > PEC	compost acceptable

Els valors de MAEC són bastant relatius; ja que depenen del tipus d'organismes davant els quals es valoren. Normalment les espècies utilitzades són algues, crustacis i peixos, determinant-se CI_{50} o CL_{50}

Els valors de PEC se solen determinar per càlculs basats en el consum del compost en qüestió i tenint en compte el nombre d'habitants de la zona estudiada i el consum mitjà d'aigua. També s'ha de considerar la possible precipitació o adsorció del compost en el col lector d'aigües residuals i el seu comportament durant el tractament en planta depuradora.

D'acord amb la *US National Academy of Sciences*, el procés de valoració de risc d'un compost està format per 4 fases: (1) identificació del perill, (2) estimació dosi/concentració-resposta/efecte, (3) estimació de l'exposició i (4) caracterització del risc. Aquest concepte ha estat adoptat per les autoritats reguladores europees en la legislació relacionada amb la valoració del risc de compostos nous i dels ja existents, desenvolupant mètodes i eines per a l'avaluació i control d'aquests (elaborats a la 7^a emmenda de la Directiva 67/548/CEE per a nous compostos, actualitzada en la Directiva 200/33/CE, i en Reglament (CEE) n°793/93 per a compostos ja existents, modificat posteriorment en el Reglament (CEE) n° 2364/2000). Els procediments per a l'avaluació es troben normalitzats en guies tècniques, amb el suport de la Directiva 93/67/CEE per als nous compostos i del Reglament (CEE) n°1488/94 per als compostos ja existents (Vandepitte i Feijtel, 2000).

3.1.4.1. Biodegradació

La descàrrega de quantitats excessives de matèria orgànica és indubtablement la causa de pol·lució aquàtica més antiga i, encara avui dia, la més extensa. Les principals fonts de contaminació orgànica són les aigües residuals domèstiques, l'agricultura, la manufactura i el processament d'aliments, i nombroses indústries implicades en el processament de materials orgànics, com són les indústries tèxtil i paperera. La conseqüència més important de la contaminació orgànica és el seu efecte sobre la concentració d'oxigen dissolt en l'aigua i sediments. En aigües no contaminades, la quantitat relativament petita de matèria orgànica morta és assimilada ràpidament per la flora i la fauna presents. Part d'aquesta és consumida per animals detritívors i incorporada a la seva biomassa. La resta és descomposta per bacteris i fongs, els quals seran consumits per organismes de nivells tròfics superiors. L'activitat dels microorganismes provoca el trencament de molècules orgàniques complexes en substàncies inorgàniques simples, com són els ions fosfats i nitrats, els quals seran assequibles com a nutrients per plantes fotosintètiques, i en diòxid de carboni i aigua. Durant aquests processos metabòlics es consumeix oxigen. No obstant això, on la càrrega orgànica és baixa, l'oxigen gastat és ràpidament reemplaçat per la fotosíntesi i per la reaireació per part de l'atmosfera.

La biodegradació es pot definir com la destrucció d'un compost químic per l'acció biològica d'organismes vius (Sánchez-Leal, 1995). El terme de biodegradabilitat està normalment reservat per al trencament de substàncies orgàniques per processos enzimàtics, que tenen com a resultat la desaparició de l'estructura molecular original i la formació de molècules orgàniques més petites, algunes de les quals són utilitzades directament per l'anabolisme cel·lular, i són convertides en CO_2 i H_2O (De Henau, 1993).

Considerant la destinació del carboni orgànic, la biodegradació d'una substància orgànica es pot representar com:

molècula orgànica + O_2 + inòcul CO_2 + biomassa (+ metabòlits si la
biodegradació és
incompleta)

La biodegradació també pot tenir lloc en absència d'oxigen (biodegradació anaeròbia) i produir addicionalment metà.

En el cas particular dels tensioactius, la degradació la duen a terme els microorganismes presents en les aigües residuals, principalment els bacteris capaços d'alimentar-se de gran varietat de compostos orgànics. A causa de la seva gran simplicitat, els bacteris són capaços d'adaptar-se a diferents tipus de substrats, com gasolina, benzè, fenols i d'altres considerats també com a tòxics. El procés global és una oxidació, de manera que la matèria orgànica es va descomponent en components més simples, que poden ser utilitzats pels bacteris.

La biodegradació és la destinació final dels tensioactius que són abocats a plantes de

tractament d'aigües residuals o directament a l'ambient aquàtic. La biodegradabilitat dels tensioactius aniónics i no iònics ha estat estudiada extensament en el laboratori (Swisher, 1987). En els últims deu anys s'han començat a fer estudis sobre la degradació dels tensioactius catiónics, sobretot dels del tipus amoni quaternari. Els marges de degradació descrits per aquests tensioactius van del 0 al 100 %, de vegades pels mateixos compostos o per compostos estructuralment similars. Això és degut als diferents sistemes i mètodes utilitzats en la determinació de la biodegradació (Boethling i Lynch, 1992). També és degut a dos aspectes del seu comportament mediambiental: la seva gran afinitat per ser absorbit per superfícies carregades negativament i la capacitat d'aclimatació dels bacteris presents en els fangs, fet que pot afavorir la seva biodegradabilitat (Swisher, 1987).

Quan es parla de biodegradació de tensioactius s'ha de diferenciar entre (De Henau 1993; Sánchez-Leal, 1995):

1. Biodegradació primària: és l'oxidació o modificació d'una molècula del tensioactiu, de manera que les seves propietats tensioactives van desapareixent, o bé el tensioactiu ja no es pot detectar pels mitjans analítics més o menys específics.

2. Biodegradació total o última: considerada com la destrucció total d'una molècula de manera que tot el carboni orgànic es transforma en CO₂, aigua i sals inorgàniques, i altres productes associats al metabolisme normal dels bacteris. La biodegradació última porta a la mineralització del carboni orgànic. Un sistema útil per al seguiment d'aquest procés és la determinació del COT (Carboni Orgànic Total); la seva desaparició en funció del temps ens indica com evoluciona el procés.

3. Biodegradació acceptable pel medi ambient: grau de biodegradació que està entre els dos anteriors i que es defineix com la degradació biològica que té com a resultat uns productes finals que són acceptables pel medi receptor (aire, terra, aigua), tant des de un punt de vista químic (DQO, DBO...) com des d'un punt de vista biològic (absència de toxicitat) (Niemi i Veith, 1988).

Tanmateix l'OECD inclou uns altres dos conceptes en parlar de biodegradació (OCDE, 1981):

— Biodegradació ràpida o fàcil: aquest terme s'aplica al compost que comença a degradar-se immediatament després de posar-lo en contacte amb una població microbiana.

— Biodegradació intrínseca: s'aplica a un compost que no comença a biodegradar-se fins que la comunitat bacteriana no s'ha aclimatat a aquest, cosa que pot passar després d'un determinat temps (hores, dies, setmanes).

Així mateix, quan es realitzen assaigs de biodegradabilitat s'han d'utilitzar poblacions

bacterianes mixtes, ja que donen més informació sobre com es comportarà el tensioactiu en el medi aquàtic. També cal tenir en compte el tipus de nutrient utilitzat per a la preparació del medi de cultiu, ja que els bacteris podrien començar a alimentar-se amb un altre tipus de compost orgànic i no degradarien el tensioactiu fins que el primer no hagués estat consumit.

Altres factors que cal considerar en la determinació de la biodegradació són l'acumulació de molècules de tensioactius en la superfície dels bacteris, l'acumulació en la interfície líquid-aire, fet que provoca la formació de l'escuma, i que concentra i elimina el tensioactiu del medi.

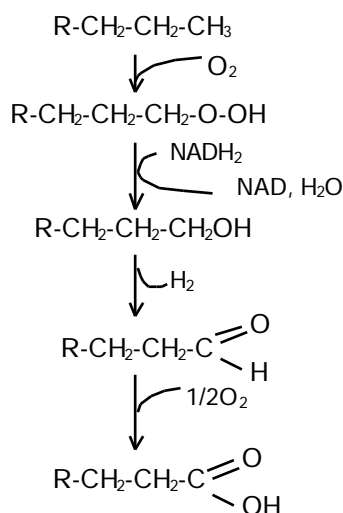
3.1.4.1.1. Mecanismes de biodegradació

Els mecanismes principals responsables de la destrucció d'una molècula orgànica són tres, i per tant aplicables al que podria passar amb una molècula de tensioactiu (Swisher, 1987):

- oxidació metílica
- b-oxidació
- oxidació aromàtica

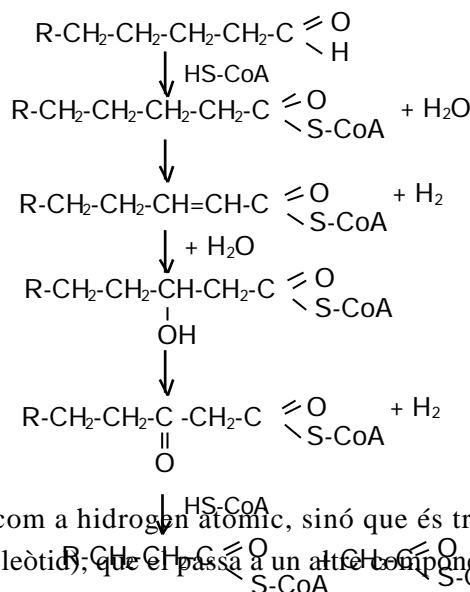
Oxidació metílica: és la que intervé en la degradació de les molècules d'hidrocarburs amb alt pes molecular, i que, com a producte final, origina una molècula d'àcid gras.

Exemple:



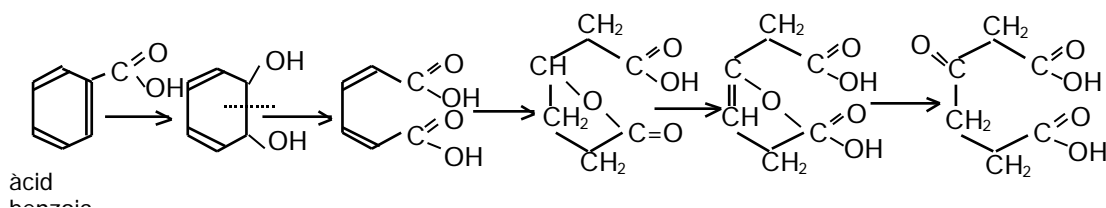
b-oxidació: és la via normal de degradació o síntesi dels àcids grassos. Aquest procés consisteix en una oxidació de dos àtoms de carboni de l'extrem de la cadena, amb alliberament del radical acetat. Successives etapes de b-oxidació comporten la total conversió de la molècula original en CO₂, aigua i biomassa.

Exemple :



L'hidrogen no es desprèn com a hidrogen atòmic, sinó que és transportat, per exemple, pel FAD (flavina adenina dinucleòtid), que el passa a un altre component l'àbil de la cèl lula.

Oxidació aromàtica: normalment comença a la molècula de catecol, que pot provenir del benzè o d'un dels seus derivats. Com a producte final apareix un compost tipus àcidcetoaldípic, el qual es veu sotmès al mecanisme de b-oxidació fins a la seva total biodegradació.



Compost de tipus cetoaldípic que pot ser posteriorment degradat, mecanisme de -oxidació

3.1.4.1.2. Paràmetres indicatius de la biodegradació

En absència de mètodes específics per a l'anàlisi del tensioactiu original remanent, o dels productes intermediaris de la seva degradació, es poden utilitzar mètodes indirectes. Aquests serien:

A. Matèria orgànica

Aquest paràmetre és indicatiu de la degradació biològica. Per a la seva determinació es solen utilitzar diferents mètodes:

a) Demanda química d'oxigen (DQO)

Consum d'oxigen per part de la mostra problema en unes determinades condicions experimentals: tractament de la mostra amb un excés de solució de dicromat potàssic en medi àcid, portat a l'ebullició per realitzar l'oxidació i, per últim, valoració per retrocés del dicromat romanent amb sulfat ferros amònic. La quantitat de dicromat consumit no sols és funció del contingut total de matèria orgànica, sinó també del seu estat d'oxidació i de la seva estructura.

El resultat analític de la DQO s'expressa com la quantitat d'O₂ equivalent a la quantitat de dicromat consumit.

b) Demanda biològica d'oxigen (DBO)

La biodegradació és un procés d'oxidació i, per tant, es pot mesurar mitjançant el consum d'O₂ que té lloc en exposar el compost a l'acció de bacteris o d'altres organismes, és a dir, per la demanda biològica d'oxigen. No obstant això, no sempre els organismes són capaços d'oxidar completament qualsevol tipus de substància a CO₂ i H₂O.

c) Formació de CO₂

Es una variant del mètode anterior. La mesura del CO₂ produït en la biodegradació d'una substància sembla donar una informació més realista del procés, ja que en el consum d'O₂ poden intervenir-hi altres oxidacions no relacionades amb la matèria orgànica.

d) Carboni orgànic total (COT i COD)

Es pot dividir en carboni orgànic total (COT) i carboni orgànic dissolt (COD). El fonament de la determinació d'aquests paràmetres és l'oxidació per diversos mètodes del carboni orgànic de la mostra, la seva transformació en CO₂ i la seva detecció per espectroscòpia d'infrarojos (IR), diferenciant el que prové de la matèria orgànica i el que prové de la matèria inorgànica.

La forma més corrent de procedir consisteix en l'eliminació del carboni inorgànic mitjançant l'addició de HCl o H₃PO₄ i "purga" del CO₂ per agitació vigorosa o bombolleig de nitrogen. Posteriorment, sobre aquesta mostra es procedeix a la determinació del carboni orgànic total o dissolt.

B. Creixement de bacteris

Aquest paràmetre es basaria a fer créixer una població bacteriana en un medi amb tensioactiu com a únic aliment; si hi ha creixement bacterià, és que hi ha hagut degradació del tensioactiu. No obstant això, té l'inconvenient de perquè sigui viable el creixement bacterià es requereixen concentracions altes d'aliment en el medi, i alguns tensioactius presenten propietats

bacteriostàtiques a aquestes concentracions.

C. Altres paràmetres indirectes

Altres paràmetres que es poden fer servir per a la valoració estarien relacionats amb les propietats tensioactives, i es podrien utilitzar com a mesures indirectes:

— Escumació: es podria suposar que si un compost escumant es va degradant amb el temps, cada vegada serà menor el seu poder d'escumació. Però això no és del tot cert, i depèn de l'estructura, el volum, la textura i la persistència, així com de la formació de metabòlits, que en alguns casos poden inhibir i en d'altres augmentar l'escuma original, la interacció amb altres productes naturals que poden formar escuma per ells mateixos, etc.

— Tensió superficial: els tensioactius tenen el poder de rebaixar el valor de la tensió superficial de l'aigua. Però, a l'igual que l'escuma solament es pot considerar com un paràmetre qualitatiu. En teoria es tindria que percebre un augment de la tensió superficial a mesura que el tensioactiu es va biodegradant, com a resultat d'una disminució de la seva concentració en el medi de cultiu.

Segons la Directiva 92/32/CEE, que modifica la Directiva 67/548/CEE, sobre substàncies perilloses per al medi ambient aquàtic s'han establert uns criteris per a considerar si un compost és fàcilment biodegradable:

- reducció del carboni orgànic dissolt (COD) > 70 %
- reducció d'O₂ o producció de CO₂ > 60 %
- relació DBO / DQO > 0,5

3.1.4.1.3. Regulació

La primera legislació específica sobre biodegradabilitat en la Comunitat Europea va estar relacionada amb els tensioactius que s'utilitzaven en detergents domèstics. Encara que aquests tenen una toxicitat baixa en mamífers, són tòxics per a organismes aquàtics (CE₅₀: 1-10 mg/l). En els últims anys de la dècada dels cinquanta, després de la substitució del sabó per detergents sintètics en la fabricació de detergents domèstics, es van observar seriosos problemes d'escuma en els rius que rebien descàrregues d'aigües residuals domèstiques. La causa es trobava en el tractament insuficient dels residus i en la biodegradabilitat relativament baixa d'un dels components tensioactius utilitzats, l'anomenat alquilbenzè sulfonat ramificat (ABS), a causa de que la seva estructura molecular ramificada complexa era difícil de descompondre per acció bacteriana, i per tant de biodegradar-se. Això va portar a la utilització de tensioactius de més fàcil degradació, com l'alquilbenzè sulfonat lineal (LAS). Tanmateix, aquest fet no va significar l'eliminació del problema, ja que l'escuma no sols era provocada

pels detergents, sinó també per causes naturals i d'altres productes, com productes residuals de tipus proteic.

Al principi de la dècada dels anys seixanta, Alemanya va ser el primer país a impulsar una activitat reguladora per imposar un límit mínim per a la biodegradació de tensioactius aniònics, i posteriorment va ser l'Organització per a la Cooperació i Desenvolupament Econòmic (OCDE). La Comunitat Europea va seguir amb una directriu estructural (Directiva 73/404/CEE) que va ser completada per directrius específiques per a tensioactius aniònics i no iònics (Directiva 73/405/CEE), i les quals van estar modificades posteriorment en les Directives 86/94/CEE i 82/243/CEE respectivament. Es va arribar a la conclusió que per a tensioactius catiònics es podien desenvolupar mètodes similars, encara que no era urgent la seva regulació a causa del baix volum de la seva producció i utilització (Boethling, 1984; De Henau, 1993).

Actualment la directriu estructural de la Comunitat Europea estableix per a totes les classes de tensioactius una biodegradabilitat mínima del 90 % (entenent per biodegradació la desaparició del compost del medi aquós).

D'altra banda, la indústria inverteix molts recursos per a la fabricació de detergents biodegradables per tal de contribuir a la millora de la qualitat de l'aigua.

3.1.4.2. Toxicitat dels tensioactius

La qualitat de l'aigua afecta a l'abundància i composició d'espècies, per tant, la seva biodiversitat i productivitat (Hao, 1996). S'ha fet necessària la determinació de la toxicitat dels diferents compostos abocats, dels seus derivats i dels productes de degradació en l'ecosistema aquàtic, degut a que són manufacturats i utilitzats en grans quantitats i és probable que es transformin en focus contaminants. (Vandepitte i Feijtel, 2000) En casos de nous compostos i formulacions noves, les proves de toxicitat han de precedir la seva fabricació a gran escala i formar part de la recerca de la viabilitat de les seves aplicacions comercials. A més, en els fulls de seguretat d'aquests productes han de venir especificades les seves característiques ecotoxicològiques, tant de biodegradació com de toxicitat. Els tests de toxicitat poden ser també incorporats en procediments de control d'efluents i ajudar a desenvolupar i perfeccionar processos de tractament d'aigües residuals.

L'any 1979 la *U.S. Toxic Substances Control Act* va manifestar la necessitat que qualsevol substància nova fos avaluada amb vista als possibles efectes de tipus:

— sanitaris (home i animals)

— ecològics (impacte en diferents ecosistemes)

A partir d'aquell moment es va començar a parlar d'ecotoxicitat i d'ecotoxicologia en els estudis d'impacte ambiental.

Els contaminants poden exercir diferents efectes, depenent de les seves característiques, de les de l'aigua receptora i de la comunitat biològica que aquest ecosistema sosté. En casos extrems poden resultar letals pels organismes presents. A concentracions baixes poden exercir efectes tòxics subletals; alguns compostos poden acumular-se en els teixits dels organismes i exercir els seus efectes després d'una exposició prolongada a concentracions que es podrien considerar baixes. També pot passar que algun d'aquests compostos passi de la presa al predador, i assolixi concentracions elevades en espècies que estan a dalt de la xarxa tròfica.

Des d'un punt de vista biològic, els efectes tòxics són significatius per la seva possible influència sobre el comportament o fisiologia dels organismes, de tal manera que es vegi alterada la seva capacitat de creixement, reproducció o supervivència, o els seus models de dispersió, ja que aquests són els principals determinants de la distribució i abundància de les espècies.

Els efectes mediambientals dels tensioactius han estat discutits en seminaris internacionals (Cationic Surfactants & Environment Symposium, 1981) i els resultats sobre la seva toxicitat en el medi aquàtic han estat recopilats en diversos treballs (Abel, 1974; Margaritis i Creese, 1979; Lewis, 1990, 1991; Boethling i Lynch, 1992; Nalewajko, 1994; Fisher i altres, 1996). No obstant això, aquests valors perden actualitat desfasats a causa del constant desenvolupament de nous tensioactius i de la reformulació dels ja existents. A més, cal assenyalar que les dades disponibles es limiten a valors de toxicitat aguda per un nombre petit de tensioactius, sobretot del tipus aniònic i no iònic. Són pocs els treballs que contenen resultats de toxicitat crònica o subletal, i encara menys aquells que fan referència als tensioactius de tipus catiònic.

3.1.4.2.1. Tipus d'assaigs de toxicitat

En estudis de toxicitat de diferents compostos químics i d'efluents industrials, i per tal de conèixer els seus efectes en diferents nivells tròfics, és convenient realitzar assaigs amb diferents espècies pertanyents als tres grups bàsics de la cadena alimentària (bacteris–descomponedors; algues–productors; crustacis i peixos–consumidors) (Frithsen i altres, 1989; Cairns i altres, 1990; Dorn i altres, 1993; Keller, 1993; Cooney, 1995; Pratt i altres, 1994; Osbild i altres, 1995; Rand i altres, 1995; Tisler i Zagorc-Koncan, 1995; Ahtiainen i altres, 1996; Akolkar i Trivedi, 1998; Rodgers i altres, 1996; Servos i altres, 1996; Verta i altres, 1996; Leal i altres, 1997; Sherry i altres, 1997; Sweet i Meier, 1997;

Sweet i altres, 1997; Fisher i altres, 1998; Sandbacka i altres, 2000).

La toxicitat de qualsevol compost en el medi aquàtic, incloent-hi els tensioactius, s'estudia bàsicament a través de dos tipus d'assaigs ben diferenciats: a) toxicitat aguda, i b) toxicitat crònica i subcrònica.

a) Toxicitat aguda: es tracta de determinar la concentració d'un compost químic que produeix un efecte advers a curt termini (normalment entre 24 i 96 hores) en un grup d'organismes, després d'una exposició d'aquests al compost (Parrish, 1995).

L'avaluació de toxicitat es realitza a través de les correlacions entre successives dosis del compost tòxic i l'efecte advers produït. Les mesures normalment utilitzades són CI_{50} i CL_{50} definides com la concentració de producte que inactiva (manca de creixement o immobilitat) o provoca la mort, respectivament, en el 50 % dels organismes amb els que s'ha assajat.

La determinació d'aquest paràmetre constitueix una primera aproximació en l'avaluació del risc de nous compostos químics (Sprague, 1988; Osbild i altres, 1995; Akolkar i Trivedi, 1996; Sherry i altres, 1997; Sweet i Meier, 1997; Sweet i altres, 1997; Fisher i altres, 1998; Sarakinos i Rasmussen, 1998; Chapman, 2000).

Per a vertebrats del medi aquàtic, similar a la que existeix per a mamífers terrestres, existeix una classificació de les substàncies en diverses categories segons diferents graus de toxicitat (NIOSH, 1976; Riva, 1989, 1991) (TAULA VII):

TAULA VII: Rangs de toxicitat amb organismes aquàtics (Riva, 1989, 1991)

Grau	Descripció	TLm (CL_{50}) 96 h
0	Perill insignificant	>1.000 mg/l
1	Pràcticament no tòxica	100 - 1000 mg/l
2	Lleugerament tòxica	10 - 100 mg/l
3	Moderadament tòxica	1 - 10 mg/l
4	Altament tòxica	< 1 mg/l

Hi ha una gran varietat d'espècies, tant d'aigua dolça com marines, que són utilitzades de manera estàndard en els assaigs de toxicitat i que han estat acceptades com a espècies patrons i com a bioindicadors ambientals (Blaise i altres 1986; Parrish, 1995; Hao, 1996; Goncharov, 1996). Entre elles s'hi troben peixos (*Oncorhynchus mykiss*, *Lepomis macrochirus*), crustacis (*Daphnia*, *Artemia*, *Gammarus*), microalgues (*Chlorella*, *Scenedesmus*) i bacteris (*Photobacterium*, *Spirillum*).

b) Toxicitat crònica i subcrònica: pretén determinar la concentració d'una substància potencialment tòxica durant una llarga exposició, que causa un efecte advers en la vida o en el cicle biològic d'una determinada espècie (Rand i altres, 1995), bé seguint canvis en el comportament, fisiològics i/o histopatològics.

Els efectes a llarg termini provocats per un tensioactiu a un determinat organisme no solen observar-se a concentracions per sota de la dècima part del valor de la seva CL_{50} .

3.1.4.2.2. Factors que influeixen en la toxicitat

Per avaluar la toxicitat de qualsevol tipus de contaminant també s'han de tenir en compte una sèrie de factors que poden influenciar els resultats; aquests factors es poden dividir en factors biòtics, aquells que depenen de l'individu mateix, i factors abiòtics, que depenen del compost i del medi (Rand i altres, 1995; Cabral i altres, 1998).

1. Factors biòtics: inclouen totes aquelles característiques que són pròpies dels organismes. Entre aquestes cal destacar:

Espècie: S'han trobat diferències de comportament davant d'un mateix tensioactiu entre diferents espècies, no sols de diferents phyla (Abel, 1974; Lewis i Hamm, 1986), sinó també dins del mateix phylum (Wängberg i Blanck, 1988; Lewis, 1990). És important establir el comportament toxicològic d'un compost utilitzant diferents espècies i la comparació entre espècies s'ha de fer amb precaució (Sprague, 1995).

Estadi de desenvolupament: s'ha intentat identificar quin és l'estadi de desenvolupament d'un organisme més sensible als tòxics, i als tensioactius en particular. En crustacis s'ha observat que quan l'individu realitza la muda és especialment sensible (Sprague, 1995). En peixos sembla que els estadis embrionari, larval i juvenil són els més sensibles (Abel, 1974; Sprague, 1995).

Mida: respecte a la mida, cal esperar que les espècies més grans siguin més resistents que les petites. Kumaraguru i Beamish (1981) estableixen que els animals petits, en presentar una taxa metabòlica més alta, absorbeixen més quantitat de tòxic, i que en animals grans la descomposició hidrolítica dels tòxics per part de les esterases microsomals del fetge és més efectiva. No obstant això, no s'ha trobat una relació que pugui ser aplicada a diferents espècies, tòxics i mides (Sprague, 1995).

Nutrició: la incorporació dels agents tòxics en la dieta pot provocar una inactivació del tòxic (quelació, hidròlisi, etc.) o la formació d'un compost molt més tòxic (Neal, 1980). La resistència d'una espècie pot incrementar segons la dieta utilitzada; la quantitat i tipus de proteïnes en una dieta pot fer variar els resultats (Neal, 1980; Sprague, 1988, 1995).

Salut i parasitisme: la presència de malalties o paràsits en els individus que s'utilitzen en un test de toxicitat pot emmascarar els resultats, per la seva menor resistència a l'agent tòxic.

Aclimatació: una exposició prèvia al compost a concentracions baixes pot fer que els valors de toxicitat disminueixin (Abel, 1974). Aquest fenomen també s'ha observat en microorganismes implicats en la biodegradació; un període de contacte previ fa que la degradació dels tensioactius catiónics sigui més ràpida (Swisher, 1987).

2. Factors abiòtics: fan referència a les característiques químiques i físiques del medi en el qual es realitzaran els assaigs, i poden afectar tant l'espècie estudiada com l'estat químic del compost. Canvis en la duresa de l'aigua, la temperatura, el pH, l'oxigen dissolt, la salinitat... poden influir sobre la toxicitat, que també dependrà del tensioactiu (Abel, 1974; Nowak, 1991; Lewis, 1992; Kennedy i Walsh, 1997). Quan els tensioactius aniònics i catiónics estan junts en aigües residuals, la toxicitat disminueix a causa de la formació de complexos insolubles (Boethling i Lynch, 1992).

Duresa de l'aigua: segons el tipus de compost de què es tracti pot fer que quan aquesta augmenta, la toxicitat augmenti (en tensioactius aniònics), disminueixi (en catiónics) o no es vegi afectada (en no iònics) (Marchetti, 1965; Abel, 1974).

Temperatura: la concentració d'un agent tòxic o dels seus metabòlits en l'organisme està influïda per processos d'absorció, emmagatzemament, metabolisme i eliminació. En animals ectotèrmics tots aquests processos depenen de la temperatura, i cal esperar que l'augment o la disminució de la temperatura ambiental influeixi en la resposta de l'organisme a la toxicitat (Doull, 1980; Nowak, 1991; Kennedy i Walsh, 1997). Normalment a l'augmentar la temperatura, augmenta la toxicitat dels tensioactius, a causa de l'acceleració de la difusió d'aquests i a que a una temperatura més alta els processos fisiològics també s'acceleren (Knauf, 1973).

Oxigen dissolt: la concentració d'oxigen dissolt afecta la toxicitat dels tensioactius (Abel, 1974). Quan més baix sigui el contingut d'oxigen més baixa serà la concentració letal. La manca d'oxigen fa que els animals la compensin amb un augment de la taxa respiratòria. L'animal, en aquestes condicions està en situació d'estrès i és més susceptible als efectes tòxics dels tensioactius (Knauf, 1973).

A més dels factors esmentats també s'ha de tenir en compte les característiques del tensioactiu que s'utilitza, i la llargada de la cadena alquíllica d'aquest. Davant una mateixa espècie s'ha observat que els tensioactius de tipus catiónic són més tòxics que els aniònics i no iònics (Lewis 1990). D'altra banda, la configuració del tensioactiu influeix molt en el seu

comportament tòxic; en el cas dels alquilbenzens sulfats LAS i ABS, tensioactius aniònics, són més tòxics els primers, de cadena lineal, que els segons, de cadena ramificada (Abel, 1974; Kimerle i Swisher, 1977; Margaritis i Creese, 1979). La longitud de la cadena hidrocarbonada sembla tenir un efecte advers sobre la toxicitat de tensioactius, de manera que quan aquesta augmenta, també augmenta el potencial tòxic de la molècula. No obstant això, la toxicitat augmenta fins a arribar a un punt crític (cadena superior a C₁₄) a partir del qual la toxicitat decreix fins a arribar a ser nul·la (Knauf, 1973; Abel, 1974; Kimerle i Swisher 1977; Margaritis i Creese, 1979; Martínez i altres, 1990; Ribosa i altres, 1993; Kralova i Sersen, 1994; Wong i altres, 1997a; Wong i altres, 1997b).

Les diverses formes moleculars de tensioactius tenen en comú un caràcter polar d'on provenen les seves tres propietats més importants relacionades amb la seva toxicitat (Devínsky i altres, 1985)

- tendència a concentrar-se a la superfície,
- reducció de la tensió superficial en solució,
- formació de micel·les, quan estan per sobre de la concentració micel·lar crítica (CMC).

D'aquestes, la propietat més important és la seva capacitat de formar agregats o micel·les (Helenius, Simons, 1975; Arnold i Johnson, 1982; Kralova i Sersen, 1994); l'efecte destructiu dels tensioactius sobre les membranes cel·lulars depèn en gran mesura d'aquesta característica.

Hi ha varies teories de com els compostos d'amoni quaternari interaccionen amb la membrana cel·lular. Richard i altres (1978) van proposar que el mecanisme d'acció estava basat en una alteració degenerativa de l'estructura de les proteïnes de la membrana a causa que les molècules tensioactives, amb característiques similars a les dels fosfolípids de la membrana (cap polar i cadena hidrocarbonada llarga) les quals competien amb aquests per unir-se a les regions hidròfobes de les proteïnes. Oros i altres (1999) també han suggerit que les cadenes alquíliques apolars intraccionen amb les zones hidrofòbiques de la bicapa fosfolipídica.

Altres estudis també recolzen la seva interacció amb la bicapa lipídica. Kralova i Sersen (1994) han desenvolupat la teoria del volum lliure, proposant que els grups polars dels tensioactius interaccionen amb els grups polars dels lípids, i les cadenes hidrocarbonades dels primers s'orienten paral·lelament amb la dels lípids i creen un volum lliure a l'extrem de la cadena.

3.1.4.2.3. Assaigs de toxicitat

A. Bacteris

Els tensioactius catiónics del tipus amoni quaternari s'han establert com a poderosos germicides, i han estat utilitzats àmpliament com a desinfectants hospitalaris, antisèptics quirúrgics, així com en empreses d'alimentació (Sexton, 1963; Lawrence, 1970; Cooper, 1988). La seva acció antimicrobiana sembla deguda al fet d'afectar l'estructura cel·lular. Tot i que els primers estudis no van establir que aquesta fos la causa de la seva toxicitat, posteriorment, utilitzant la respiració bacteriana com a resposta del metabolisme, es va veure que aquesta estava afectada (Lawrence, 1970).

Els assaigs de toxicitat amb comunitats bacterianes s'utilitzen tant per avaluar el grau de contaminació d'efluents i aigües naturals, com pels compostos químics individuals. Els seus avantatges davant altres d'organismes, com peixos i mamífers, són la curta durada de la prova i la seva simplicitat experimental.

Aquests assaigs es basen en l'activitat respiratòria (Dutka i altres, 1983), en la incorporació de l'acetat i l'activitat de la glucosidasa (Barnhalt i Vestal, 1983), en el metabolisme de la glucosa i la incorporació de la timidina (Bauer i Capone, 1985; Vives-Rego i altres, 1986; Martínez i Vives-Rego, 1988) i en l'activitat exoproteolítica (Vives-Rego i altres, 1986). Actualment també s'utilitza per a avaluar la toxicitat en bacteris la capacitat bioluminiscent d'algunes espècies de bacteris (*Photobacterium phosphoreum*); aquests emeten llum com a mecanisme d'alliberament d'energia durant el seu metabolisme normal; la intensitat de llum emesa és, per tant, una mesura de l'activitat metabòlica bacteriana (Bulich, 1979; Ribó, 1992; Sherry i altres, 1997). Aquesta espècie ha estat àmpliament utilitzada per a la determinació de la toxicitat en efluents industrials (Ahtiainen i altres, 1996; Priha, 1996; Rodgers i altres, 1996; Verta i altres, 1996; Leal i altres, 1997; Middaugh i altres, 1997; Sherry i altres, 1997) i de productes químics, (Kaiser i Devillers, 1994; Sweet i Meier, 1997; Sweet i altres, 1997) entre ells tensioactius (Dorn i altres, 1993; Poremba, 1993; Ribosa i altres, 1993; Sherrard i altres, 1996). Altres estudis, on s'han comparat diferents assaigs de toxicitat amb bacteris (Reteuna i altres, 1989; Poremba i altres, 1991), van determinar que l'assaig "Microtox" (assaig d'inhibició de la bioluminiscència) era el més sensible.

B. Microalgues

Les algues són un component molt important dels ecosistemes aquàtics, i la fotosíntesi algal és una font considerable d'aportació d'oxigen al medi. Estudiar els efectes tòxics sobre aquesta comunitat resulta d'interès per a conèixer quin és l'impacte causat per la descàrrega de tensioactius en l'ambient aquàtic (Stauber, 1995; Lewis, 1995a, 1995b; Alkolkar i Trivedi, 1996).

S'han fet pocs estudis sobre toxicitat en algues; el tipus de tensioactiu, l'espècie utilitzada i els paràmetres considerats varien molt amb els diferents treballs. Els tensioactius més utilitzats

han estat els de tipus aniònic i no iònic (Ostroumov i altres, 1990; Knocke i altres 1992; Riva i Vallès, 1994; Wong i altres, 1997a; Oros i altres 1999), sobre tot el LAS (Gilbert i Pettigrew, 1984; Lewis i Hamm, 1986; Kimerle, 1989), i els marges de toxicitat per a aquest tensioactiu varien segons l'espècie utilitzada (CE_{50} 72h: 1,4-116 ppm) (Lewis i Hamm, 1986).

Els tensioactius catiònics són els menys estudiats, i els valors de toxicitat trobats són més baixos que per a la resta de tensioactius (Röderer, 1987; Lewis, 1990; Rie i Grimme, 1993). Dintre d'aquest grup els compostos més estudiats són els d'amoni quaternari (Walker i Evans, 1978; Nyberg, 1988; Versteeg i altres, 1992; Kralova i Sersen, 1994).

Els estudis que comparen la sensibilitat entre espècies han mostrat que la resposta davant un mateix tensioactiu és espècie-específica (Wängberg i Blanck, 1988); tanmateix, la resposta interespecífica per tensioactius catiònics és menys variable que per altres tipus de tensioactius (Lewis i Hamm, 1986). Les diferències entre espècies poden ser degudes a diferències de les parets cel·lulars algals (Ukeles, 1965).

Com ja ha estat esmentat, l'efecte destructiu dels tensioactius en les membranes biològiques depèn en gran mesura de la capacitat d'aquests a formar micel·les, és a dir, de la concentració micel·lar crítica (CMC) (Helenius i Simons, 1975) El procés destructiu solament té lloc per sobre de la CMC (Arnold i Johnson, 1982). Per sota de la CMC, els efectes dels tensioactius depenen de la seva capacitat per a unir-se a les proteïnes i lípids de les membranes, alterant les seves funcions (Helenius i Simons, 1975; Walker i Evans, 1978; Grant i Borowitzka, 1984; Nyberg, 1985; Kralova i Sersen, 1994; Oros i altres, 1999).

També ha estat observat que les betaïnes (acetats de trimetilamoni), les quals estan químicament relacionades amb els amoni quaternaris, inhibeixen el creixement de *Selenastrum capricornutum*. No obstant això, els efectes bactericides de les betaïnes no són tan poderosos com els dels amoni quaternari (Erenst i Miller, 1982).

C. Crustacis

Els invertebrats ocupen una posició clau en els ecosistemes aquàtics com a consumidors intermediaris tant de les cadenes alimentàries planctòniques com de les bentòniques. En les cadenes tròfiques planctòniques els principals consumidors primaris (herbívoros) són crustacis i rotífers, i en les cadenes tròfiques bentòniques, els més importants convertidors de la biomassa, tant viva com morta, són larves d'insecte i crustacis (Persoone i Janseen, 1993).

Els assaigs de toxicitat s'han desenvolupat amb diversos representants de comunitats aquàtiques, com poden ser crustacis (copèpodes, cladocers, amfípodes), rotífers, i larves d'insecte (principalment plecòpters, efemeròpters i dípters).

No obstant això, degut a raons pràctiques i de sensibilitat s'han utilitzat bàsicament crustacis cladòcers i molt particularment els dàfnids (*Daphnia magna*) (Woltering i altres, 1987; Elendt i Bias, 1990; Lewis, 1991; Boethling i Linch, 1992; Dorn i altres, 1993; Persoone i Janseen, 1993; Fernández-Casalderrey i altres, 1995; Versteeg i altres, 1997; Mark i Solbe, 1998). L'elevada sensibilitat de *Daphnia magna* respecte a altres espècies no solament fa referència als invertebrats, sinó també a microalgues i peixos (Kappeler, 1982; Guhl i Gode, 1989; Demkowicz-Dobrzanski i altres, 1993; Rodgers i altres, 1996; Mark i Solbe, 1998; Nelson i Roline, 1998).

A pesar d'aquest fet, molts laboratoris assenyalen diversos problemes en el seu cultiu sota condicions controlades i en la realització de test de toxicitat utilitzant aquesta espècie. Això es reflecteix en la gran variació en els resultants obtinguts, causada per la utilització de diferents medis de cultiu, diferents tipus d'aliment i diferents genotips de *Daphnia magna* (Elendt i Bias, 1990; Enserink i altres, 1993).

La majoria d'assaigs s'han dut a terme amb tensioactius aniònics i no iònics (Margaritis i Creese, 1979; Martínez i altres, 1990; Lewis, 1991; Vives-Rego i altres, 1991; Wong i altres, 1997b; Sandbacka i altres, 2000). Són poques les dades que es tenen sobre tensioactius catiònics, essent els més estudiats els d'amoni quaternari (Kappeler, 1982; Waters, 1982; Boethling i Linch, 1992; Sandbacka i altres, 2000). Els estudis comparatius entre els diferents tipus de tensioactius estableixen que els més tòxics són els amoni quaternaris (Guhl i Gode, 1989; Lewis, 1991).

D. Peixos

L'interès en la utilització de peixos en ecotoxicologia es deu tant a factors ecològics com econòmics. Molts peixos ocupen una posició elevada com a depredadors dins l'ecosistema, i presenten rutes complexes per les quals els contaminants poden arribar a l'organisme, bé directe o indirectament, a través de la cadena alimentària, amb efectes acumulatius (Solbé i Solbé, 1993).

D'entre tots els tensioactius també han estat els de tipus aniònic i no iònic els més estudiats en peixos, ja que són els més utilitzats i representen la font principal de pol·lució per tensioactius (Dorn i altres, 1993; Wong i altres, 1997b; Sandbacka i altres, 2000). Entre ells els més comuns han estat els alquil aril sulfonats, com l'alquilbenzè sulfonat (ABS) o l'alquil sulfonat lineal (LAS), i els alquil sulfats (Calamari i Marchetti 1973; Abel, 1974; Gilbert i Pettigrew, 1984; Kimerle, 1989).

S'ha vist que la toxicitat aguda dels tensioactius varia considerablement amb l'espècie. Tot i així, la majoria dels tensioactius són altament tòxics ($CL_{50} 48h = 1-10 \text{ mg/l}$), una proporció

petita pot ser classificada com que té una toxicitat mitjana (CL_{50} 48h = 10-100 mg/l), i molt pocs que tenen una toxicitat baixa (CL_{50} 48h = 10.000 mg/l) (Svobodová i altres, 1993).

Els tensioactius tenen un efecte físico-químic comú sobre els components lipídics de les membranes, i les poden danyar. A causa que la tensió superficial de l'aigua disminueix, els lípids són menys repel lents a l'aigua, cosa que porta a hidratar i engrandir el volum cel lular (Singer i altres, 1995). A concentracions baixes de tensioactiu aquest engrandiment és reversible. A altes concentracions elevades pot portar a una supressió dels processos metabòlics de les cèl lules. Una exposició a llarg termini pot comportar necrosi i mort cel lular deguda principalment a un deteriorament de l'epiteli branquial. A més a més, l'exposició del peix a certs tensioactius pot causar canvis en l'activitat d'enzims respiratoris (Argese i altres, 1994). Els tensioactius també poden interaccionar amb les proteïnes de membrana i les poden desnaturalitzar; de fet aquesta propietat dels detergents és aprofitada en estudis bioquímics. Els tensioactius també poden lesionar la capa protectora de mucus de la pell, debilitant-la i disminuint així la resistència a infeccions.

La causa immediata de mort per enverinament agut de tensioactius, on es presenten greus lesions branquials, és deguda freqüentment a asfíxia o a la pèrdua d'estabilitat osmòtica o iònica. Encara que la lesió branquial té lloc com a resultat d'enverinament per tensioactius, cal establir si la mort és deguda a la pèrdua d'alguna funció branquial o a alguna altra forma de lesió interna (Wester i Roghair, 1992).

3.2. MATERIAL I MÈTODES

3.2.1.COMPOSTOS UTILITZATS

Els compostos utilitzats en aquest treball van ser cinc suavitzants catiónics d'us industrial, en forma emulsionada i microemulsionada. D'aquests cinc, tres eren del tipus amoni quaternaris i dos del tipus imidazolina quaternària.

TAULA VIII: Compostos utilitzats en el present estudi

Compost	Estructura	Origen	Matèria activa (%)	Pes molecular	Concentració emulsió / microemulsió (g / l)
Amonis quaternaris					
DSDMAC	$\left[\begin{array}{c} R \\ \\ N-CH_3 \\ \\ R-CH \end{array} \right] Cl^-$ R= sèu hidrogenat	KAO Coop S.A. Barberà del V.	75	563	0,23 / 34
DSEMAMS	$\left[\begin{array}{c} R \\ \\ N-CH_2CH_2OH \\ \\ R-CH \end{array} \right] CH_3SO_4^-$ R= ?	KAO Coop. S.A. Barberà del V.	85	800	0,23 / 38,2
DSCEEMAMS	$\left[\begin{array}{c} O \\ \\ R-C- \\ \\ R-C- \\ \\ O \end{array} \quad \begin{array}{c} N-CH_2CH_2O \\ \\ CH \end{array} \right] CH_3SO_4^-$ R= cadena alquíllica de sèu	Witco (Barcelona)	-	800	0,23 / 40,8
Imidazolines quaternàries					
DSAEMIMS	$\left[\begin{array}{c} R \\ \\ CH_3-C \\ \\ CH \end{array} \quad N-CH_2CH_2NHC(=O) \right] CH_3SO_4^-$	Witco (Barcelona)	75	732	0,23 / 34,1
DAAIMS	-	KAO Coop. S.A. Barberà del V.	80	743	0,23 / 36,3

DSDMAC: Clorur de dialquil dimetilamoni

DSEMAMS: Metilsulfat de dialquil hidroxietil metilamoni

DSCEEMAMS: Metilsulfat de dialquil carboxietil hidroxietil metilamoni

DSAEMIMS: Metilsulfat de diestaeril amidoetil metil imidazolina

DAAIMS: Metilsulfat de dialquil amido imidazolina

Les emulsions i microemulsions van ser subministrades pel Laboratori de Tensioactius i Detergència de l'Institut d'Investigació Tèxtil i de Cooperació Industrial de Terrassa

(INTEXTER, UPC) i estan subjectes a secret de patent. Les concentracions provades corresponen a les proporcionades per aquest laboratori.

Per a l'obtenció de les miroemulsions es van utilitzar els agents microemulsionants: 2-isopropanol, n-octà i un tensioactiu no iònic, en unes proporcions, també subjectes a secret de patent.

3.2.2. PARÀMETRES AMBIENTALS

Per a determinar el contingut en matèria orgànica de les aigües residuals, s'han desenvolupat diversos mètodes, i els més utilitzats són: la demanda biològica d'oxigen (DBO), la demanda química d'oxigen (DQO) i el carboni orgànic total (COT).

3.2.2.1.- Demanda biològica d'oxigen (DBO₅)

La demanda biològica d'oxigen mesura l'oxigen dissolt que és utilitzat pels microorganismes en l'oxidació bioquímica de matèria orgànica. Aquest paràmetre és un dels més utilitzats en la gestió tècnica de la qualitat de l'aigua i en el tractament d'aigües residuals, ja que s'utilitza per a determinar la quantitat aproximada d'oxigen que és necessària per a establir biològicament la matèria orgànica present (Metcalf i Eddy, 1991).

En el present estudi l'assaig de la DBO₅ es va realitzar seguint la norma AFNOR T 90-103 (1971) (veure l'annex 1 de material i mètodes). La quantitat d'oxigen consumit, expressat en mg O₂/l, es mesura després de tenir la mostra en incubació durant 5 dies a 20 °C de temperatura i a les fosques. S'han d'utilitzar dilucions de tensioactiu per tal que al final d'aquest període encara resti un 40-60 % d'O₂.

Després d'aquest temps d'incubació, l'oxigen dissolt es va mesurar mitjançant un elèctrode selectiu d'oxigen amb un oxímetre (Beckman, model 1008).

La DBO₅ es calcula utilitzant l'equació següent:

$$DBO_5 \text{ (mg O}_2\text{/l)} = \left(\frac{V_t}{V_e} (T_0 - T_5) \right) - \left(\left(\frac{V_t}{V_e} - 1 \right) (D_0 - D_5) \right)$$

on: V_t = volum del matràs aforat en què s'ha efectuat la dilució
 V_e = volum de mostra en dilució
 T_0 = lectura d'oxigen dissolt de la mostra + aigua de solució a t_0
 T_5 = lectura d'oxigen dissolt de la mostra + aigua de solució a t_5
 D_0 = lectura d'oxigen dissolt de l'aigua de dilució a t_0
 D_5 = lectura d'oxigen dissolt de l'aigua de dilució a t_5

L'oxidació bioquímica és un procés lent i, teòricament, triga un temps indefinit a completar-se. No obstant això, en un període de vint dies l'oxidació s'ha completat en un 95-99 %; ara bé, en un termini de cinc dies ja s'ha assolit entre un 60-70 %, per la qual cosa ja es disposa de la informació necessària, i no és necessari un període de temps més llarg.

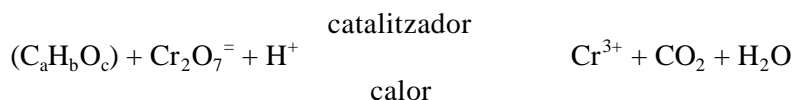
A pesar dels inconvenients que té la determinació de la DBO_5 , tant per la llarga durada de l'anàlisi com per l'escassa precisió i exactitud (un 20 % d'error), el seu valor és un bon indicador de la biodegradabilitat de la mostra, i aquest es pot utilitzar per a determinar les dimensions de les instal·lacions de tractament d'aigües residuals i també per a mesurar l'eficàcia d'alguns processos de tractament. Tanmateix, en cas de substàncies orgàniques, sòlides o líquides, la determinació de la DBO no es pot considerar com una determinació vàlida de la biodegradabilitat de la substància, sinó que únicament es pot considerar com una prova exploratòria d'aquesta (Real Decret 363/1995, BOE 133, modificat posteriorment en el Real Decret 700/1998, BOE 110).

Per determinar el valor de cada una de les mostres de suavitzant es van fer quatre rèpliques; es va fer la mitjana aritmètica per a cada un d'ells i es va obtenir la seva desviació estàndard (*sd*).

3.2.2.2. Demanda química d'oxigen (DQO)

La DQO és una mesura de les necessitats potencials d'oxigen de l'aigua. El seu valor es determina efectuant l'oxidació química de la matèria orgànica i inorgànica presents. El seu valor comprèn tot el que pot tenir una demanda d'oxigen, especialment la major part dels compostos orgànics biodegradables o no, i les sals minerals oxidables (sulfurs, sals de metalls de valència inferior).

El mètode utilitzat va ser la norma AFNOR T 90-101 (1971) (veure l'annex 2 de material i mètodes). L'equivalent d'oxigen de la matèria orgànica que es pot oxidar es mesura utilitzant un agent químic fortament oxidant ($K_2Cr_2O_7$) en medi àcid (H_2SO_4) i a temperatura elevada (150 °C). Per a facilitar l'oxidació de certs compostos orgànics és necessari un catalitzador (Ag_2SO_4). La reacció utilitzant dicromat com a agent oxidant es pot representar esquemàticament com:



La fórmula emprada per a calcular-la és:

$$\text{DQO (mgO}_2\text{/l)} = \frac{800 (T - M)}{\text{mg mostra}} \cdot N \text{ (normalitat sal de Mohr)}$$

on: T= valoració del testimoni
M= valoració de la mostra
N= (ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ x normalitat $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) / ml sal de Mohr

Per cada mostra es van fer quatre rèpliques; es va fer la mitjana aritmètica per a cada compost i es va obtenir la seva desviació estàndard (*sd*).

La DQO és un assaig més curt, dues hores, més reproducible i exacte que la DBO i menys susceptible a interferències de matèries tòxiques, la qual cosa el converteix en una anàlisi de rutina i en un paràmetre útil per al control de plantes depuradores. Aquest mètode per a substàncies orgàniques, sòlides o líquides, s'ha de considerar com un indicador d'oxidabilitat, i s'utilitza com mètode pràctic d'avaluació de la matèria orgànica (Real Decret 363/1995, BOE 133, modificat posteriorment en el Real Decret 700/1998, BOE 110).

3.2.2.3. Biodegradació

La biodegradació es pot definir com la destrucció d'un compost químic per l'acció biològica d'organismes vius. El seguiment d'aquesta es va dur a terme mesurant el consum de carboni orgànic total (COT) durant un període de temps de 28 dies segons dos mètodes: la biodegradació inherent (OCDE 302B, 1992), assaig modificat de Zahn-Wellens, i la biodegradació ràpida (OCDE 301E, 1992), assaig modificat d'*Screening*.

La determinació del COT per al seguiment de la biodegradació es va realitzar per què és un paràmetre quantitatiu que ens permet conèixer la quantitat de matèria orgànica present en una mostra líquida i per tant s'utilitza com un paràmetre ambiental, presentant una major reproduïbilitat i un temps d'anàlisi més curt que les tècniques tradicionals (DQO i DBO) (Metcalf i Eddy, 1991).

a. Biodegradabilitat inherent. Assaig modificat de Zahn-Wellens

Aquest tipus d'assaig ens proporciona informació sobre si el compost en estudi té un determinat potencial per a degradar-se. Per a l'aplicació d'aquest mètode, el compost ha de ser soluble en aigua i no volàtil, i les concentracions que cal utilitzar, relativament altes (100 mg/l); no obstant això, en aquest cas s'han utilitzat concentracions no superiors a 20 mg/l a causa del poder bactericida d'aquest tipus de compostos.

Aquest mètode es basa a posar en contacte en solució aquosa una quantitat coneguda de carboni orgànic procedent del compost que cal analitzar juntament amb nutrients minerals i amb una població bacteriana procedent de fangs activats de depuradora urbana, en condicions aeròbies (aireig continu), temperatura (22 ± 3 °C) i llum (difosa) determinades durant 28 dies (veure l'annex 3 de material i mètodes). El procés de degradació es controla per la determinació del carboni orgànic total en la solució filtrada a intervals predeterminats (cada 48 hores), ajustant el pH (7-8) si fos necessari.

Les mostres van ser contrastades durant tot l'assaig davant d'un blanc (aigua amb nutrients i inòcul) i d'un compost control (dietilenglicol) de biodegradació coneguda (el qual assoleix el 100 % de degradació als 10-15 dies). Per cada compost es van fer dues rèpliques, i l'assaig es va fer per duplicat, per tal d'utilitzar fangs de períodes diferents.

La determinació del carboni orgànic dissolt s'ha efectuat amb un analitzador TOCOR.

Per al càlcul de la biodegradació en cada moment t es fa servir l'equació:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_B}{C_A} \right] * 100$$

on: D_t = Percentatges de biodegradació en un temps t
 C_A = Valor inicial de C orgànic de la mostra(mg/l)
 C_t = Valors de C orgànic de la mostra en el moment t (mg/l)
 C_B = Valors de C orgànic del blanc en el moment t (mg/l)

b. Biodegradabilitat ràpida. Test Screening modificat

En aquest mètode es considera que el compost en estudi és l'única font de carboni orgànic i aquest és sotmès a l'acció d'una biomassa relativament petita. S'utilitza la mesura del carboni orgànic total dissolt com a seguiment de la biodegradació total, establint per a calcular la biodegradabilitat un temps límit de 28 dies després de l'inici de l'assaig.

L'objectiu és la mesura de la biodegradabilitat final de compostos orgànics no volàtils i solubles en aigua, en un medi aquós aeròbic amb nutrients, a una concentració inicial corresponent a 4-50 mg/l de COT (carboni orgànic total) (veure annex 4 de material i mètodes).

L'inòcul utilitzat va ser una suspensió de bacteris procedents d'un sòl fèrtil, procedent de jardí.

D'acord amb aquest tipus d'assaig, es considera que una substància és fàcilment degradable quan la disminució de matèria activa, després de l'assaig, és superior al 80 %. Les substàncies que resulten biodegradables per aquest mètode, es considera que, en el medi natural, sofriran una degradació ràpida i fàcil.

El desenvolupament de l'assaig es va controlar mitjançant un assaig blanc (aigua) solament amb inòcul i nutrients, i un compost control (dietilenglicol), que es van realitzar paral·lelament amb l'assaig tant per determinar el carboni orgànic dissolt de l'inòcul, com per tenir un seguiment de l'evolució de la biodegradació. El compost control ha d'assolir el 70 % de DOC dins els 28 dies amb una concentració inicial corresponent a 20 mg de DOC/l; si no els assoleix, l'assaig es descarta. Per cada compost es van fer dues rèpliques, i l'assaig es va fer per duplicat en dos períodes de temps diferents.

El seguiment de l'assaig es fa un cop per setmana durant els 28 dies determinant-ne el contingut del carboni orgànic mitjançant un analitzador TOCOR.

L'equació de càlcul és:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl_t}}{C_o - C_{bl_o}} \right] * 100$$

on: D_t = percentatge de biodegradació en un temps T
 C_o = concentració inicial de C orgànic de la mostra (mg C org/l)
 C_{bl_o} = concentració inicial de C orgànic del blanc (mg C org/l)
 C_t = concentració de C orgànic de la mostra en el moment t (mg C org /l)
 C_{bl_t} = concentració de C orgànic del blanc en el moment t (mg C org /l)

3.2.3. ASSAIGS DE TOXICITAT AGUDA

L'objectiu dels tests de toxicitat aguda és determinar la concentració d'un compost químic o efluent, o el nivell d'un agent (temperatura o pH), els quals provoquen una resposta de deteriorament en un grup d'organismes de prova, durant una exposició de curta durada sota condicions controlades (Cooney, 1995). A causa que la mort d'organismes és una resposta fàcilment detectable, el test de toxicitat aguda més comú és el de letalitat.

Normalment es mesura la concentració letal mitjana (CL_{50}) que és aquella concentració en què moren el 50 % dels individus. No obstant això, en el cas d'alguns invertebrats, com la *Daphnia*, com que la mort de l'animal és difícil de determinar, s'utilitza un altre tipus de resposta, com és la immobilitat dels individus (manca de moviment) i s'estima la concentració efectiva mitjana (CE_{50}) definida com la concentració en què el 50 % dels individus estan immòbils. En microalgues el tipus de resposta que mesurem és el d'inhibició del creixement, definint la concentració inhibidora del creixement (CI_{50}) com aquella que redueix al 50% la població algal. En el cas dels bacteris bioluminiscent s'utilitza la reducció d'emissió de llum, i

es defineix la concentració efectiva mitjana (CE_{50}). També es pot determinar per a totes les espècies la CE_{10} i la CE_{90} , que equivalen a la concentració que provoca un efecte al 10 i al 90 % de la població respectivament.

Es determina la relació entre les concentracions del compost utilitzades i els percentatges d'organismes exposats afectats i es pot dibuixar una corba/recta de concentració-efecte.

És important realitzar una bateria d'assaigs amb diferents espècies per a establir l'efecte tòxic que pot produir un efluent o un compost químic (Frithsen i altres, 1989; Cairns i altres, 1990; Dorn i altres, 1993; Keller, 1993; Pratt i altres, 1994; Cooney, 1995; Osbild i altres, 1995; Rand i altres, 1995; Tisler i Zagorc-Koncan, 1995; Ahtiainen i altres, 1996; Akolkar i Trivedi, 1996; Rodgers i altres, 1996; Servos i altres, 1996; Verta i altres, 1996; Leal i altres, 1997; Sherry i altres, 1997; Sweet i Meier, 1997; Fisher i altres, 1998; Sandbacka i altres, 2000). Realitzant únicament un tipus d'assaig hi ha el risc que l'espècie escollida sigui particularment sensible als compostos provats o pel contrari sigui resistent, falsejant l'apreciació de la toxicitat (Pontasck i Cairns, 1991; Rand i altres, 1995). Es poden utilitzar espècies amb diferents graus de complexitat (procariotes, eucariotes unicel·lulars, invertebrats i vertebrats) definint-se millor l'efecte tòxic sobre un ecosistema.

La toxicitat aguda de cada compost es va determinar en diferents espècies d'organismes seguint els mètodes estandarditzats per a cadascuna:

1. Assaig per bioluminiscència en bacteris (CE_{50} 15min) (norma AFNOR T90-320)
2. Assaig d'inhibició de creixement cel·lular en microalgues (CI_{50} 72h) (norma 201 OCDE, 1984)
3. Assaig d'inhibició de la mobilitat en dàfnies (CE_{50} 24h) (norma 202 OCDE, 1984)
4. Assaig de toxicitat aguda en peixos (CL_{50} 48h) (norma 203 OCDE, 1992)

En tot test de toxicitat aguda es descriuen dues fases d'experimentació:

1a. Assaig preliminar, per tal de determinar entre quin interval de concentració es troben les concentracions tòxiques.

2a. Assaig definitiu, en què es fan servir una sèrie de concentracions creixents, definides per l'interval trobat en l'assaig preliminar, mitjançant les quals es podrà calcular la concentració inhibidora o letal que afecta el 50 % de la població.

3.2.3.1. Bioassaig amb bacteris luminescents

La utilització d'organismes bioluminescents com a tècnica per a determinar ràpidament i de forma fiable la toxicitat de mostres aquoses es va establir fa pocs anys i és una alternativa a la

utilització d'animals per assaigs de toxicitat. Aquest assaig ha estat presentat per *Microbics Corporation* (Bulich, 1979).

Aquest bioassaig utilitza com a organisme de prova un bacteri marí luminescent i no patògen de l'espècie *Photobacterium phosphoreum*. Aquests bacteris emeten llum com a mecanisme d'alliberament d'energia, en el curs del seu metabolisme normal. La intensitat de llum emesa és, per tant, una mesura de l'activitat metabòlica dels bacteris. Quan aquests organismes estan exposats a una mostra tòxica, l'emissió de llum disminueix de forma proporcional a la toxicitat de la mostra. És un assaig basat en la inhibició de l'activitat enzimàtica de la luciferina, que és l'enzim responsable de la bioluminescència d'aquests i altres bacteris.

Per a determinar la toxicitat en bacteris luminescents es va seguir la norma AFNOR T90-320. El procediment que es va utilitzar està detallat en l'annex 6 de material i mètodes i l'aparell Microtox model 500 (Microbioc Corporation, USA).

A partir de la mesura de llum emesa, es calcula la funció GAMMA (G) per cada una de les dissolucions de la mostra, corregida segons el control. La funció GAMMA és la relació entre la intensitat de llum perduda (disminució de llum) i la intensitat de llum restant, i, en una escala logarítmica, segueix una relació lineal amb la concentració de la mostra. Aquesta funció és un indicador de la inhibició enzimàtica.

$$\text{GAMMA (G)} = ((\text{CR} \times I_0) - I_t) / I_t ; \quad \text{CR} = I_{ct} / I_{co}$$

on: CR: factor de correcció
I_{ct}: llum remetent al temps t del control
I_{co}: llum a temps 0 del control
I₀: llum a temps 0 de la mostra
I_t: llum a temps t de la mostra

La toxicitat d'una mostra s'expressa com la concentració de mostra que redueix la intensitat de llum en un 50 % (G = 1) durant un temps d'exposició de 15 minuts. Aquesta concentració s'anomena concentració efectiva de la mostra que causa el 50 % de reducció en l'emissió de llum (CE₅₀), i depèn de la temperatura, del temps d'exposició i de la naturalesa química de la mostra.

Els càlculs realitzats per obtenir la recta i la CE₅₀ de cada una de les mostres es van fer gràcies al programa Microtox® Software. Per cada un dels suavitants es van fer quatre repeticions, obtenint-se quatre CE₅₀ per cada un d'ells.

En l'assaig de biodegradació inherent, es va determinar paral·lelament la toxicitat en *Photobacterium phosphoreum*. D'aquesta manera, podem conèixer l'evolució de la biodegradació del compost i de la seva toxicitat. En aquest cas es va utilitzar el protocol de Toxicitat Aguda 100 % facilitat per Microtox . Per últim, es va determinar la concentració

de tensioactiu catiònic que queda en el sobrenadant en cada una de les determinacions de toxicitat i de COT segons el mètode proposat pel Comitè Internacional d'Anàlisi de la Detergència: Determinació de Detergents Aniónics i Catiònics (veure annex 5 de material i mètodes).

3.2.3.2. Determinació de la inhibició del creixement algal

Els procediments en els quals s'utilitzen algues són valuosos tant per a determinar la productivitat primària d'una aigua com per a assajar-ne la toxicitat (Cronin i Dearden, 1995). Les algues són el principal productor en la comunitat aquàtica, i per això es troben en la base de les cadenes alimentàries aquàtiques (Stauber, 1995; Lewis, 1995a, 1995b; Akolkar i Trivedi, 1996; Canela i altres, 1998).

El que es pretén amb aquest assaig és determinar quina és la concentració que inhibeix el 50 % del creixement de diferents espècies d'algues verdes unicel·lulars en un període de temps determinat (72 hores). Aquesta concentració s'anomena concentració inhibidora del creixement i se la designa com CI_{50} 72h. El principi d'aquest mètode és exposar el cultiu en creixement exponencial de diferents espècies de microalgues a diverses concentracions de diferents compostos test, en unes condicions de temperatura i fotoperíode constants. La inhibició del creixement es determina en relació amb un cultiu control sotmès a les mateixes condicions de temps, temperatura i fotoperíode. La norma seguida per a determinar la CI_{50} va ser 201 OCDE (1984).

Per a determinar la toxicitat en algues es van utilitzar les espècies de microalgues d'aigua dolça: *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B, *Scenedesmus subspicatus* CCAP 276/20 i *Selenastrum capricornutum* CCAP 278/4, procedents del Culture Collection Algae and Protozoa (Cumbria, Regne Unit). Aquestes són algues verdes unicel·lulars d'aigua dolça, que pertanyen a la classe clorofícies, ordre de les clorococals, família de les Ooscistàcies (*Chlorella* i *Selenastrum*) i família de les Escenedesmatàcies (*Scenedesmus*). Es caracteritzen per presentar una paret cel·lular simple, uninuclears amb un únic cloroplast. Aquestes espècies estan recomanades per a la realització de tests i cultius per tenir un creixement ràpid (norma 201 OCDE).

Condicions del cultiu

El creixement dels cultius mare es va realitzar en sistemes de cultiu tancat (Bath Culture) en flascons de 250 ml amb un volum de solució de 100 ml. Es va disposar d'un aparell de cultiu consistent en una camera amb un agitador orbital amb control de la temperatura (22 ± 2 °C) i amb il·luminació contínua de 2.500 lux aproximadament. La concentració inicial de cèl·lules

en els cultius mare va ser aproximadament de 10^4 cèl·lules/ml, com recomana la norma.

Condicions de l'assaig

Tant en l'assaig preliminar com en els assaigs definitius es van utilitzar tubs d'assaig de borosilicat de 18 x 180 mm com a flascons d'experimentació. Amb el medi de cultiu (veure la composició en l'annex 7 de material i mètodes) es van fer les dilucions corresponents per cada un dels tensioactius provats per a obtenir les concentracions que calia experimentar. El volum final per cada tub va ser de 10 ml. Cada tub s'inoculava amb un mil·lilitre de cultiu algal en creixement exponencial en condicions estèrils, i s'assolia una concentració cel·lular aproximada de 10^3 cèl·lules/ml.

Condicions d'assaig:	Fotoperíode: 16 h llum / 8 h fosc
	Il·luminació: 2.500 luxs
	Temperatura: 22 ± 2 °C
	pH medi: $7,1 \pm 0,1$
	Temps d'assaig: 72 h

En primer lloc es va portar a terme l'assaig preliminar, per cada un dels tensioactius que calia analitzar, per a trobar l'interval (entre 0,01 % i 90 % d'una solució inicial) en el qual els percentatges d'inhibició del creixement anaven de 0 a 100 %; a partir d'aquests resultats es va fer l'assaig definitiu. En l'assaig definitiu es van disposar de tres tubs d'assaig per concentració, i es va provar com a mínim sis concentracions. Es van realitzar quatre repeticions per cada un dels compostos. Cada una de les repeticions es va contrastar davant d'un blanc (100 % de medi de cultiu) (sis tubs en cada repetició).

Càlculs realitzats

Després del període d'assaig (72 hores) es va determinar la inhibició del creixement de cada tub per comptatge cel·lular, utilitzant una camera de Neubauer. A l'inici de l'assaig es van comptabilitzar el nombre de cèl·lules inoculades en tres dels blancs, i es va considerar la seva mitjana com el valor inicial de cèl·lules per cada un dels tubs.

Els valors obtinguts compresos entre el 10 % i el 90 % d'inhibició, es van representar respecte al logaritme de la concentració de cada un, i es va calcular una recta de regressió a partir de la qual es va deduir la CI_{50} 72h.

Els valors d'inhibició de creixement per a representar les rectes es van calcular de la manera següent:

Nre total de cèl·lules (NTC):

$$NTC = \text{nre. Cèl lules comptades} \times Kn \times 1.000$$

$$Kn = \frac{1}{\text{Volum dels quadres comptats}} \quad * \text{ dil lució}$$

$$\text{Volum d'un quadre} = 0,0625 \text{ mm}^2 \times 0,2 \text{ mm} = 0,0125 \text{ mm}^3$$

Creixement cel·lular: és la diferència entre el nombre de cèl·lules al final de l'assaig i el nombre de cèl·lules en el temps 0.

$$\text{Creix. cel.: nre cel 72h} - \text{nre cel. 0h}$$

Percentatge d'inhibició del creixement: aquest percentatge es calcula com la diferència relativa entre el creixement cel·lular del control i el del suavitzant assajat.

$$\% = \frac{\text{Creix.cel.}_c - \text{Creix.cel.}_t}{\text{Creix.cel.}_c} \times 100$$

Per a l'obtenció de la CI_{50} 72h es va utilitzar el model logit o regressió logística, obtenint-se també els marges de confiança per a aquesta concentració.

3.2.3.3. Determinació de la inhibició de la mobilitat en *Daphnia magna*:

El fonament d'aquest assaig és determinar la concentració en la qual, en 24 hores, immobilitza el 50 % de les dàfnies. Aquesta concentració, anomenada concentració inhibidora de la mobilitat, es designa per CE_{50} 24h. Per a la realització del test es va seguir la norma 202 OCDE (1984).

El cladòcer d'aigua dolça, *Daphnia*, conegut com a puça d'aigua, s'utilitza com a organisme d'assaig de toxicitat en aigua dolça. Pertany a la subclasse dels branquiòpodes, família *Daphniidae*, de la classe crustacis. L'espècie utilitzada va ser la *Daphnia magna* (Strauss, 1820) obtinguda per partenogènesi i de mida tal que travessen un tamís de 800 µm de malla i queden retingudes en un altre de 375 µm; es considera que assoleixen aquesta mida a les 24 hores de vida.

Condicions del cultiu

Per al cultiu mare de les dàfnies es van fer servir tancs de 20 litres i les condicions de cultiu van ser:

Temperatura:	$20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$
Fotoperíode:	16 h llum/8 h fosc
pH:	$8,0 \pm 0,2$

Cada 5 dies s'hi afegien 5 ml de solució nutritiva (0,75 g d'extracte de carn + 0,75 g de glucosa en 50 ml d'aigua destil·lada).

Condicions de l'assaig

Per a realitzar l'assaig preliminar es van utilitzar nou concentracions compreses entre el 0,01 % i el 90 % (ambdós incloses) de una solució inicial de cada un dels compostos que calia analitzar. En cada tub s'afegeixen cinc individus.

La solució inicial de cada compost es va fer a partir d'una concentració inicial de 1 g/l de cada una de les emulsions i microemulsions, i es van diluir en aigua de dilució per dàfnies (veure-ne la composició en l'annex 8 de material i mètodes).

L'assaig es va controlar mitjançant dicromat potàssic ($K_2Cr_2O_7$) del qual es coneix la CE_{50} 24h = 0,9-1,5 mg/l.

Condicions de l'assaig:

Temperatura: $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$

Llum: 24 hores de fosc.

Al cap de 24 hores d'haver començat l'assaig es van quantificar les dàfnies que encara estaven mòbils. Les dàfnies que eren incapaces de desplaçar-se dins dels 15 segons posteriors d'haver-se agitat el tub es van considerar immòbils. D'aquesta manera es determina l'interval de concentracions que fa variar el percentatge de immobilització de 0 a 100 %.

L'assaig definitiu permet avaluar els percentatges de dàfnies que són immobilitzades en 24 hores per, com a mínim, sis concentracions diferents dels compostos que cal analitzar i deduir, per interpolació, la CE_{50} 24h.

Per cada concentració es van fer servir quatre tubs, com també per al blanc (100 % aigua de dilució), i es van fer quatre rèpliques de cada assaig. Les condicions van ser les mateixes que per a l'assaig preliminar.

Càlculs realitzats

El percentatge d'immobilització (P) per a cada concentració es va calcular a partir de la següent equació:

$$P = 100 - 5 \times (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$$

sent n_1 , n_2 , n_3 i n_4 el nombre de dàfnies mòbils dins de cada tub per cada concentració.

Per a l'obtenció de la CE_{50} 24h es va utilitzar el model logit o regressió logística, obtenint-se

també els marges de confiança per a aquesta concentració.

3.2.3.4. Assaig de toxicitat aguda en peixos

Els tractaments aguts de les mostres per a l'obtenció de la CL₅₀ 96h es van realitzar amb l'espècie *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) (*Teleostei*; *Salmonidae*). Aquesta espècie està recomanada per a la realització d'aquest tipus d'assaig per la seva alta sensibilitat davant diversos compostos químics i per ser representativa dels cursos fluvials. A més, és de fàcil obtenció i manteniment en condicions de laboratori.

Condicions d'establació

Els animals utilitzats procedien de la piscifactoria d'engreix de l'Alt Urgell, Molí Vell (Pons, Lleida), i presentaven una mida de 10-12 cm de longitud. Es van tenir durant dues setmanes en aclimatació abans de començar l'assaig. L'aclimatació de les truites es va fer en tres tancs de 500 l de capacitat. L'aigua utilitzada va ser de la xarxa declorada, i diluïda amb un 10 % d'aigua destil·lada fins a obtenir les condicions següents

Condicions de l'aigua: Duresa total: 300-340 mg/l;
 pH: 7,8 ± 0,1
 Temperatura: 14 ± 1 °C

Condicions de l'assaig

Els assaigs es van dur a terme seguint la norma 203 OCDE (1992).

Durant el tractament agut (96 hores) els animals no van ser alimentats, i el medi va ser renovat totalment a les 48 hores d'haver començat l'assaig (assaig semiestàtic).

En primer lloc es va realitzar l'assaig preliminar, utilitzant cinc animals per cada concentració, i posteriorment l'assaig definitiu amb deu individus per tanc. El volum d'assaig va ser de 20 litres, i les condicions d'assaig: temperatura: 15 ± 1 °C
 fotoperíode: 12 hores llum / 12 hores fosc
 aireig continu

Càlculs realitzats

Es va fer el seguiment diari del nombre d'individus morts per a obtenir la mortalitat acumulada

durant tot el període d'assaig. Amb el nombre total d'animals morts a les 96 hores es va determinar la CL_{50} 96h.

Per a l'obtenció de la CL_{50} 96h es va utilitzar el model logit o regressió logística, obtenint-se també els marges de confiança per a aquesta concentració.

3.2.4. MÈTODES ESTADÍSTICS

Com ja s'han referit al descriure els mètode d'assaig de cada una de les espècies, s'han utilitzat com indicadors de la toxicitat la CE_{50} (concentració efectiva: *Photobacterium phosphoreum*, *Daphnia magna*), CI_{50} (concentració inhibidora: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum*) i CL_{50} (concentració letal: *Oncorhynchus mykiss*). Aquests paràmetres representen la concentració en la que s'obté un 50 % de la resposta que es mesura, poguent ser comparables entre ells.

Existeixen varis models matemàtics per a avaluar la toxicitat i el model Logit n'és un (Agresti, 1996). En aquests models es designa com a p la probabilitat de que es doni una determinada resposta en una proporció d'individus; aquest p és funció d'una variable d'exposició x (logaritme de la concentració). Es denomina concentració efectiva mitja, CE_{50} (CI_{50} o CL_{50}) quan $p = 0,5$.

El model logit, o de regressió logística, la relació entre p i x ve donada per: $\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 x$, on la funció logit és: $\text{logit}(p) = \log(p/1-p)$. Quan $p = 0,5$, $x = \log(CE_{50})$, i per tant $CE_{50} = \exp(-\beta_0 / \beta_1)$. Els càlculs per a obtenir les rectes logit es van fer amb el programa estadístic SPSS 8.0 per a Windows.

La comparació de les $CE_{50}/CI_{50}/CL_{50}$ de cada una de les espècies i els seus respectius marges de confiança calculats per logit, pot ser suficient per a valorar les toxicitats de cada suavitzant en condicions similars (Conney, 1995; Ellersieck i La Point, 1995; Rand i altres, 1995).

Tanmateix, per a la representació gràfica de les rectes s'ha utilitzat la regressió lineal entre els percentatges de resposta de cada una de les espècies i el logaritme de la concentració.

Per analitzar i comparar la toxicitat dels diferents suavitzants i l'efecte de l'emulsió i de la microemulsió en cada una de les espècies s'ha aplicat el mètode de l'ANOVA amb dos factors fixes (factor A amb dos nivells: emulsió i microemulsió; factor B, els suavitzants, amb cinc nivells: DSDMAC, DSEMAMS, DSCEEMAMS, DSAEMIMS i DAAIMS; resposta: $\log CE_{50}$, CI_{50} o CL_{50} segons espècie) i quatre repeticions, utilitzant els intervals de confiança 0,95 per a identificar el comportament dels subgrups homogenis per als nivells de cada factor (els

subgrups homogenis estan formats per aquells intervals que se solapen). Per a *Oncorhynchus mykiss*, atès que únicament es té un sol valor per a cada assaig, no es pot fer l'ANOVA per a aquesta espècie; tanmateix s'han utilitzat les representacions gràfiques per a explicar el comportament dels suavitzants en aquesta espècie. La variable resposta és el logaritme de CE_{50} , CI_{50} i CL_{50} , atès que, fent un estudi preliminar es va observar que aquesta transformació validava les suposicions de l'ANOVA (Normalitat i Homoscedasticitat). No obstant això, es va realitzar l'anàlisi de residus de les diferents ANOVA, amb la qual cosa es van validar aquestes suposicions com es pot veure en la Figura 6.

També s'ha utilitzat l'ANOVA amb tres factors (factor A amb dos nivells: emulsió i microemulsió, factor B (suavitzants) amb cinc nivells: DSDMAC, DSEMAMS, DSCEEMAMS, DSAEMIMS i DAAIMS; i factor C (espècies) amb 6 nivells: *Photobacterium phosphoreum*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia magna* i *Oncorhynchus mykiss*) i quatre repeticions (excepte *Oncorhynchus mykiss*), per poder analitzar i comparar globalment el comportament de les sis espècies en front els suavitzants emulsionats i microemulsionats.

Per a l'anàlisi de l'ANOVA s'ha utilitzat el programa estadístic STATGRAPHICS 6.1.

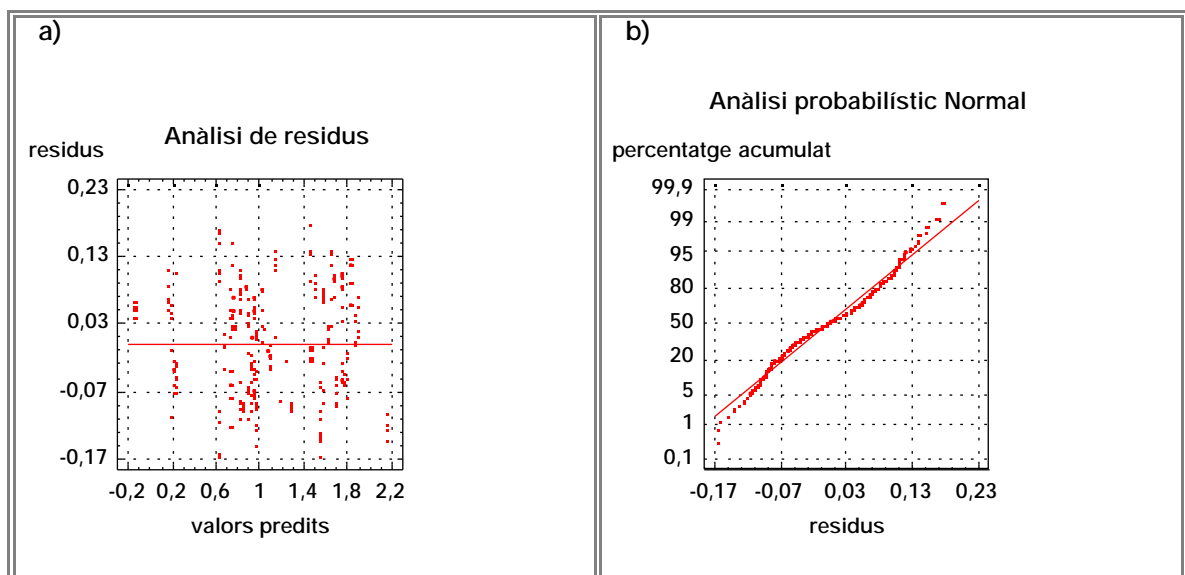


FIGURA 6: Representació de la validació de la transformació de les dades per a comprovar que segueixen les suposicions de l'ANOVA (Normalitat i Homoscedasticitat). Amb l'Anàlisi de residus (a) validem la homogeneïtat de les variàncies, i amb l'Anàlisi probabilístic Normal (b), la normalitat. (ANOVA amb tres factors).