



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**DETERMINACIÓN MULTIRESIDUAL DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS
DE AGUA MEDIANTE GC/MS CON UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN
LÍQUIDO/LÍQUIDO DENOMINADO MICROEXTRACTOR**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de

QUÍMICO AMBIENTAL

LUCIANO MARCIAL BAHAMONDE BAHAMONDE

Director de Seminario de Título: Dra. Adriana Nario Mouat

Profesor Patrocinante: M.Cs. Sylvia Copaja Castillo

Octubre de 2011

Santiago - Chile

UCH-FC
Q. Ambiental
B151
C.1



ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por el candidato:

LUCIANO MARCIAL BAHAMONDE BAHAMONDE

“DETERMINACIÓN MULTIRESIDUAL DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE GC/MS CON UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO/LÍQUIDO DENOMINADO MICROEXTRACTOR”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. Adriana Nario Mouat

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

M.Cs. Sylvia Copaja Castillo
Profesor Patrocinante

Dra. Isel Cortés Nodarse
Corrector

Sra. Ana María Parada Carrasco
Corrector

Santiago de Chile, Octubre de 2011



A mis hijos, Elisa y Mateo (los motores)

A mi Madre, Marcia (el timón)





LUCIANO MARCIAL BAHAMONDE BAHAMONDE

Nace un 29 de noviembre del año 1985 en Santiago; hijo de Marcia Bahamonde, con quien en 1986 se traslada a España, donde residen durante 2 años. Al volver a Chile entra al Jardín Reina de la Paz, en su querida comuna de toda la vida, Macul; desde ya se perfila como un alumno un tanto inquieto.

Su educación básica y media la realiza en el Colegio Regina Pacis, del cual guarda fabulosos recuerdos; de seguro el colegio también los guarda de él pues siempre se destacó por su mala conducta, su buena relación con su entorno y sus buenas calificaciones. Ingres a la carrera de Química Ambiental en 2004, teniendo ya a su hija Elisa, de 2 meses de edad.

Al entrar a la Universidad de Chile descubre que debe calmarse y no distraerse en clases pues el nivel de exigencia es radicalmente distinto; cambia su actitud y se ordena. Entre los estudios, conoce mucha gente nueva y con ellos disfruta grandes momentos, vive la vida de Hijo de Bello en asambleas y marchas esperanzadas de los primeros años.

En el año 2009 llega Mateo, su hijo menor, quien le da un nuevo empujoncito para terminar su carrera. Y una vez más con la ayuda de Pepe Grillo logra fijarse objetivos más claros.

En agosto de 2010 ingresa a la Comisión de Energía Nuclear en donde, con el gran apoyo de Adriana Nario y Ana M^a Parada (Any), puede desarrollar el presente seminario de título. Ahí conoce grandes personajes como Oscar Andonie, Francisco Díaz, Oscar Jiménez, Ximena Videla y Marco Acuña.

AGRADECIMIENTOS

El primer agradecimiento es para mi madre (Pepe Grillo y Editora/Correctora de mi tesis) que con sus coscorriones y amor me hizo llegar hasta acá. A mis hermosos hijos Elisa mi colorina, y Mateo mi ojos de estrella, que me alegraron continuamente con sus rarezas, belleza e inteligencia.

Gracias a mi novia Paula, por su amor, amistad, compañía y diversión, por estar ahí a pesar de comportarme tozudamente y ser a veces un tanto lesa. Gracias por incorporarme al grupo, que se portó conmigo como uno más.

Le agradezco al gran equipo de la Sección de Agricultura de la Comisión de Energía Nuclear: Adriana Nario, Ana M^a Parada (Any), Ximena Videla y Marco Acuña de quienes recibí la colaboración y enseñanza para adquirir nuevas capacidades. Gracias también a Oscar Andonie, Francisco Díaz y Oscar Jiménez, por los gratos almuerzos, conversaciones y consejos.

Agradezco también a la Profesora Sylvia Copaja, que con paciencia me entregó muchos conocimientos y consejos a lo largo de la carrera, sobre todo al realizar mi Unidad de Investigación bajo su tutela.

Le doy las gracias a todos mis amigos de la U que en el transcurso de esta etapa siempre estuvieron ahí: Leo (aún sigue ahí), Ricardo, Lucero, Xime, Adrian, Seba, Cata, Ingrid, Nico I., Dani, Vale, Yeanice, Carol, Sofí, Manzano, Leiva, Nico S., Joe, Juanana's y varios más!

Agradezco también a mis familiares que siempre estuvieron ahí en momentos difíciles: desde siempre mi Tío René + Crew, AGUANTE!; mi Abuela Mami Norma; y desde el cielo mi Abuelo Memo Bahamonde, el inigualable. Los quiero.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ser Humano y Plaguicidas	2
1.2 Técnica de Extracción	3
1.3 Plaguicidas Estudiados	4
1.4 Efectos en el Medio Ambiente	16
1.5 Técnicas de Análisis	18
1.5.1 Cromatografía	18
1.5.2 Cromatografía de Gases (GC)	19
1.5.3 Espectrometría de Masas	21
1.5.4 Extracción Líquido/Líquido	24
1.5.5 Microextractor	25

1.6	Hipótesis	29
1.7	Objetivos	29
1.7.1	Objetivo General	29
1.7.2	Objetivos Específicos	29
II	MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1	Recolección de las Muestras de Agua	30
2.2	Puntos de Muestreo	31
2.3	Preparación de los Estándares	34
2.4	Determinación de los Tiempos de Retención (t_r)	35
2.5	Creación de una Biblioteca en GC/MS	35
2.6	Parámetros Instrumentales en GC	35
2.7	Determinación de los Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)	36
2.8	Extracción con Microextractor	37
III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1	Determinación de los Tiempos de Retención (t_r)	39
3.2	Identificación de Compuestos por MS	40
3.3	Curvas de Calibración	44
3.4	Curva de Calibración utilizando Microextractor	45

3.5	Eficiencia del Sistema de Extracción Microextractor	52
3.6	Determinación de los Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)	54
3.7	Resultados en Muestras de Agua	57
3.7.1	Parámetros <i>In-situ</i>	57
3.7.2	Resultados de Cromatografía de Gases	61
IV DISCUSIÓN GENERAL		66
V CONCLUSIONES		69
VI REFERENCIAS		71
VII ANEXOS		75
ANEXO A		76
ANEXO B		81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Plaguicidas utilizados en Viña Ventisquero	4
Tabla 2	Propiedades fisicoquímicas de plaguicidas estudiados	15
Tabla 3	Tiempos de retención (min) de los plaguicidas estudiados	39
Tabla 4	Coincidencia porcentual de plaguicidas estudiados	43
Tabla 5	Datos depurados de áreas de Sulfotep	47
Tabla 6	Tratamiento estadístico de Sulfotep	48
Tabla 7	Ecuación y coeficiente de correlación de los 12 plaguicidas	49
Tabla 8	Eficiencias (%) de la extracción de plaguicidas	52
Tabla 9	Eficiencias y Log Pow de plaguicidas	53
Tabla 10	LD y LC de plaguicidas	56
Tabla 11	Parámetros <i>in-situ</i> Primera Campaña: 30 de junio, 2010	57
Tabla 12	Parámetros <i>in-situ</i> Segunda Campaña: 29 de julio, 2010	58
Tabla 13	Parámetros <i>in-situ</i> Tercera Campaña: 2 de noviembre, 2010	59
Tabla 14	Parámetros <i>in-situ</i> Cuarta Campaña: 18 de noviembre, 2010	59
Tabla 15	Primera Campaña (en μgL^{-1}): 30 de junio, 2010	61
Tabla 16	Segunda Campaña (en μgL^{-1}): 29 de julio, 2010	62
Tabla 17	Tercera Campaña (en μgL^{-1}): 2 de noviembre, 2010	63
Tabla 18	Cuarta Campaña (en μgL^{-1}): 18 de noviembre, 2010	64

Tabla 19	Tratamiento estadístico de Diazinon	76
Tabla 20	Tratamiento estadístico de Clorotalonil	76
Tabla 21	Tratamiento estadístico de Clorpirifos	77
Tabla 22	Tratamiento estadístico de Triadimefon	77
Tabla 23	Tratamiento estadístico de Ciprodinil	78
Tabla 24	Tratamiento estadístico de Kresoxym metil	78
Tabla 25	Tratamiento estadístico de Fenpropatrin	79
Tabla 26	Tratamiento estadístico de Azinfos etil	79
Tabla 27	Tratamiento estadístico de Acrinatrín	80
Tabla 28	Tratamiento estadístico de Esfenvalerato	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura molecular de Clorotalonil	5
Figura 2	Estructura molecular de Captan	6
Figura 3	Estructura molecular de Kresoxim metil	7
Figura 4	Estructura molecular de Ciprodinil	8
Figura 5	Estructura molecular de Diazinon	9
Figura 6	Estructura molecular de Clorpirifos	9
Figura 7	Estructura molecular de Azinfos etil	10
Figura 8	Estructura molecular de Sulfotep	11
Figura 9	Estructura molecular de Acrinatrin	12
Figura 10	Estructura molecular de Esfenvalerato	12
Figura 11	Estructura molecular de Fenpropatrin	13
Figura 12	Estructura molecular de Triadimefon	14
Figura 13	Movimiento y destino de plaguicidas en el medio ambiente	18
Figura 14	Diagrama de un cromatógrafo de gases	21
Figura 15	Esquema general de extracción líquido-líquido	24
Figura 16	Esquema que muestra partes importantes del Microextractor	28
Figura 17	Montaje del sistema Microextractor	28
Figura 18	Recolección de muestras	31

Figura 19 Punto de muestra P0	32
Figura 20 Punto de muestreo PE	32
Figura 21 Punto de muestreo RT	33
Figura 22 Foto satelital de puntos de muestreo	34
Figura 23 Montaje del sistema de extracción	38
Figura 24 Cromatograma de Clorpirifos 1 mgL ⁻¹	40
Figura 25 Espectro de masa de Sulfotep	41
Figura 26 Espectro de masa de Diazinon	41
Figura 27 Espectro de masa de Clorotalonil	42
Figura 28 Cromatograma múltiple de plaguicidas	44
Figura 29 Curva de calibración de Sulfotep	50
Figura 30 Curva de calibración de Diazinon	51
Figura 31 Curva de calibración de Triadimefon	51
Figura 32 Comportamiento de la eficiencia	54
Figura 33 Curva de calibración de Sulfotep	55
Figura 34 Concentración v/s SD de Sulfotep	55

RESUMEN

La agricultura continúa siendo una de las principales áreas productivas de nuestro país; esto exige mejorar continuamente los estándares de los procesos implicados en la actividad; para ello la ciencia ha creado –entre otras tecnologías- plaguicidas que son usados en diversas formas y con distintas finalidades, apuntando siempre a obtener un óptimo equilibrio rendimiento-calidad.

Las distintas sustancias desarrolladas para aplicación en la agricultura son de variado carácter químico, lo que implica que su comportamiento en los diferentes sistemas en que se movilizan, es variado también. A menudo los plaguicidas han evidenciado potenciales riesgos para la salud del ser humano y/o para el entorno en el que son utilizados. Este potencial riesgo no necesariamente significa que tenga que ser discontinuado su uso sino que implica el deber de monitorear las concentraciones utilizadas como también medir las cantidades que persisten en los sistemas donde los plaguicidas continúan su ciclo: la atmósfera –cuando son de carácter volátil-, el suelo y el agua. Este último sistema es particularmente dinámico y sensible, por lo que medir la presencia de plaguicidas en ella cobra gran importancia.

El trabajo de este seminario de título se enfocó en la determinación de plaguicidas en aguas que alimentan un sector vitivinícola y que potencialmente arrastran contenido de sustancias utilizadas en las faenas agrícolas. Para extraer los plaguicidas desde la matriz agua se utilizó una técnica de extracción líquido/líquido, mediante un

sistema denominado **Microextractor**, el que fue diseñado por el científico alemán Dr. Berthold Kettner a comienzos de los años 2000. Esta técnica es particularmente interesante ya que, además de minimizar la cantidad de solvente utilizado, reemplaza el **diclorometano** –utilizado habitualmente para este tipo de extracciones- por **n-hexano**, solvente más amigable con el medio ambiente y por tanto menos nocivo para el ser humano.

Para detectar y cuantificar la presencia de plaguicidas en las muestras recolectadas se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Co. (GC- μ ECD, GC-MS).

En este trabajo se realizaron 4 campañas de muestreo, las que fueron sometidas a análisis cromatográfico y de parámetros *In-situ*. Para el análisis cromatográfico se seleccionó 12 pesticidas para la extracción mediante Microextractor. De todos los pesticidas analizados sólo se encontró Clorpirifos en todas las muestras recolectadas en un rango de entre 2 y 4 ppb aproximadamente, a través de todas las campañas de muestreo.

ABSTRACT

In our country, agriculture remains one of the main productive activities, which means a need to improve the products generated for this science has developed pesticides that are used in various ways and for different purposes, aiming always for the best quality.

However substances applied are of varied chemical nature, which means that their behavior in different systems for those mobilized is also varied. Often pesticides have shown potential risks to human health or to the environment in which they are used, which does not necessarily mean the discontinuation of its use, but implies the duty to monitor both the concentrations used, and also to measure remaining quantities in systems where they continue their cycle, such as the atmosphere-when these are of a volatile-, soil and water. The latter system is particularly dynamic and sensitive as measuring the presence of pesticides in it becomes important.

This title seminar focused on the determination of pesticides in waters that feed a wine sector, potentially dragging the content of substances used in agricultural work. To extract the pesticides from the water matrix using a technique of liquid/liquid extraction, using a system called **Microextractor**, which was designed by German scientist Dr. Berthold Kettner in the early 2000s. This technique is particularly striking it minimizes the amount of solvent used also to replace the commonly used for this type of

dichloromethane extraction by **n-hexane**, which is more friendly to the environment, and therefore less harmful to humans.

To detect and quantify the presence of pesticides in samples collected used a gas chromatograph Agilent Co. (GC- μ ECD, GC-MS).

In this work were 4 sampling campaigns, which were subjected to chromatographic analysis, and *In-situ* parameters. Chromatographic analysis for 12 pesticides were selected for extraction by Microextractor. Of all the pesticides studied, only Clorpirifos was found in all samples collected, in a range between approximately 2 and 4 ppb through all sampling campaigns.

I. INTRODUCCIÓN

El aporte del área agropecuaria al Producto Interno Bruto (PIB) nacional se ha mantenido alrededor del 5% (ODEPA 2009), lo que representa una participación significativa que debe ser en lo posible sostenida en el tiempo.

Dadas las exigencias de los mercados internacionales, los productos de exportación deben cumplir con los estándares de calidad de los países importadores, considerando la observancia de normas para el desarrollo de productos libres de patógenos. A fin de cumplir con estas exigencias del mercado y lograr rendimientos provechosos es que la industria agropecuaria utiliza sustancias químicas que le permitan obtener productos libres de plagas.

Estos químicos son conocidos como plaguicidas y son definidos como una sustancia o mezcla en cualquier estado físico cuya finalidad sea la de controlar, combatir y/o prevenir plagas o enfermedades. En general tienen el objetivo de proteger al hombre de organismos que afecten su salud y/o su ambiente (Estrada, 1998, Robledo, 1998 y Ortiz-Hernández y col. 1997).

Los fabricantes de plaguicidas están constantemente evaluando nuevas moléculas y formulaciones que consideren la dimensión ambiental, de modo de que su composición y efectos sean lo más específicos posible, disminuyendo el riesgo de contaminación hacia el operador agrícola y hacia los compartimientos ambientales.

Sin embargo los plaguicidas presentan en su gran mayoría algunos riesgos para la salud humana.

1.1. **Ser Humano y Plaguicidas**

El ser humano puede estar expuesto a los plaguicidas por tres vías principales: inhalación, exposición oral o exposición cutánea (Waldemar F., 1982). Los efectos de estos productos sobre la salud del ser humano dependerán principalmente del tiempo y de la concentración a la que ha sido expuesto un individuo; es así como se puede diferenciar la sintomatología aguda de la crónica. La primera se define como una exposición en breve tiempo a altas concentraciones, que produce alteraciones rápidas y de elevada consideración pero sin embargo tratables; por el contrario la sintomatología crónica es aquella que describe una exposición prolongada en el tiempo a concentraciones moderadas a bajas, lo que provoca un deterioro no obstante lento, generalmente de carácter grave e irreversible como mutaciones genéticas, malformaciones congénitas o muerte por cáncer.

Estos graves efectos en la salud de la población exigen a la actividad agrícola monitorear continuamente la presencia de plaguicidas en los diversos productos que entrarán en contacto con el ser humano, como frutas, verduras, hortalizas, vinos y otros alimentos vegetales, incluso el agua destinada para su consumo.

Es en este punto que el presente trabajo cobra gran importancia, pues busca analizar la presencia de plaguicidas en muestras de aguas provenientes de un sector

vitivinícola de la VI Región de nuestro país, a través de un análisis multiresidual mediante cromatografía gaseosa con detectores Micro ECD y espectrómetro de masas.

1.2. **Técnica de Extracción**

Para extraer los plaguicidas desde la matriz agua se utilizará una novedosa técnica basada en la extracción líquido/líquido, mediante un sistema llamado Microextractor, creado por el académico alemán Dr. Berthold Kettner a comienzos de los años 2000. Esta técnica apunta a reducir los niveles de solvente utilizados para realizar extracciones de compuestos apolares que comúnmente son extraídos con diclorometano, solvente muy tóxico que puede provocar desde cefaleas hasta cáncer. Este solvente es de alta volatilidad por tanto su efecto no queda restringido sólo al laboratorio, ya que forma parte de los compuestos orgánicos (COVs), de los que es conocida su alta toxicidad (“Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública”, 2002). Así la técnica Microextractor reemplaza al solvente diclorometano por n-hexano, un solvente muy eficiente en la extracción de compuestos apolares. Este solvente cuenta además con la ventaja de ser menos nocivo para el ser humano y presentar una presión de vapor mucho menor a la del diclorometano en similares condiciones (diclorometano: 47,4 kPa; hexano: 17,3 kPa, ambos a 20 °C). Además la técnica de Microextractor utiliza menor volumen de extractante ya que necesita solamente 50 mL de hexano por cada litro de muestra de agua, en comparación con las técnicas tradicionales que utilizan desde los 100 hasta los 250 mL de solvente por

muestra. Esto genera cantidades menores de desechos líquidos en el laboratorio y con ello minimiza los impactos negativos hacia el medio ambiente.

1.3. Plaguicidas estudiados

El estudio implicado en este trabajo de Tesis, ha sido desarrollado en conjunto entre la Comisión Chilena de Energía Nuclear y Viña Ventisquero, la que ha encargado el estudio multiresidual de plaguicidas utilizados en sus predios, particularmente en la Localidad de Apalta, Sexta Región de Chile. Los plaguicidas a estudiar según lo solicitado por Viña Ventisquero son 22 y se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Plaguicidas utilizados en Viña Ventisquero

Plaguicida	
Carbaryl	Flusilazol
Sulfotep	Kresoxym metil
Diazinon	Propiconazol
Clorotalonil	Tebuconazol
Clorpirifos	Fenpropatrin
Triadimefon	Azinfos metil
Ciprodinil	Fenarimol
Penconazol	Azinfos etil
Captan	Acrinatrín
Triflumizol	Esfenvalerato
Fludioxonil	Azoxystrobin

En el desarrollo del trabajo se observó que no todos los plaguicidas propuestos por Viña Ventisquero para el análisis multiresidual respondieron a la extracción con n-hexano mediante el Microextractor, además de presentar señales deficientes en la cromatografía gaseosa a bajas concentraciones (orden de los ppb), lo que motivó a reducir la lista inicial de 22 plaguicidas a 12. Estos plaguicidas son los que finalmente se analizaron en las muestras de agua recolectadas en la zona de estudio. A continuación se muestra una reseña de cada uno de los plaguicidas analizados en las muestras de agua de Viña Ventisquero:

- Clorotalonil

Es un fungicida de contacto, preventivo y curativo que controla una amplia gama de enfermedades fúngicas que afectan a cultivos de hortalizas, cereales, cítricos y frutales. Su nombre IUPAC es Tetracloroisofalonnitrilo y masa molar 265.9 g mol^{-1} . Su vida media por biodegradación varía entre 8,1 y 8,8 días en agua marina; su vida media por fotólisis es igual a 65 días en la superficie del agua y su vida media por hidrólisis tiene un valor de 38,1 días en aguas alcalinas (pH de 9). A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

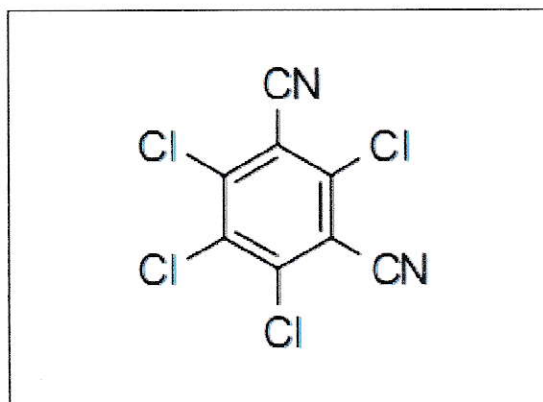


Fig. 1. Estructura molecular de Clorotalonil

- Captan

Es un fungicida de contacto preventivo y curativo de amplio espectro. Favorece el crecimiento sano del follaje, proporcionando más superficie fotosintética. Su nombre IUPAC es 1,2,3,6-Tetrahidro-N-(triclorometil)ftalimida 3a,4,7,7a-Tetrahidro-2-((triclorometil)tio)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona y masa molar $300,6 \text{ gmol}^{-1}$. Este plaguicida se hidroliza fácilmente bajo condiciones ambientales de pH, con una vida media de 18,8 horas, 4,9 horas y 8,3 minutos a pH de 5, 7 y 9 respectivamente. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

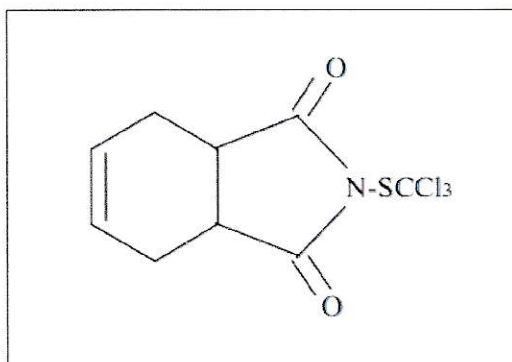


Fig. 2. Estructura molecular de Captan

- Kresoxim metil

Es un fungicida de contacto, preventivo, curativo y erradicante. Inhibe la respiración mitocondrial de los hongos a través del bloqueo de la transferencia de electrones entre el mitocondrio b y el citocromo c. Su nombre IUPAC es acetato de metil (*E*)-metoxi-imino[α -(*o*-toliloxi)-*o*-tolil y masa molar $313,35 \text{ gmol}^{-1}$. En el agua se adsorbe a sólidos suspendidos y sedimentos y se degrada muy fácilmente bajo la acción de los microorganismos aeróbicos, con una vida media de 1,2 días. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

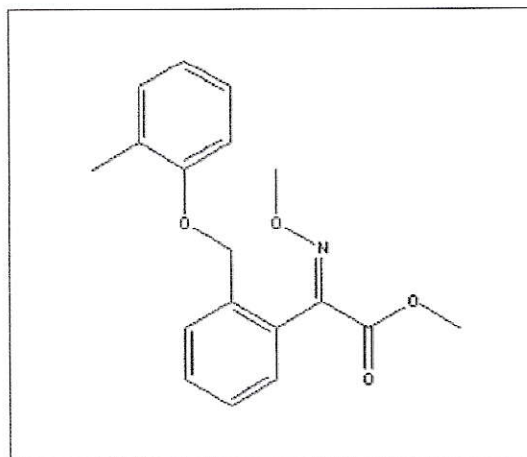


Fig. 3. Estructura molecular de Kresoxim metil

- Ciprodinil

Es un fungicida de contacto, muy persistente, con una acción residual de aproximadamente 2 meses. Altera la síntesis de varios aminoácidos entre ellos de la metionina. Inhibe la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo y la penetración dentro de la planta. Su nombre IUPAC es 4-ciclopropil-6-*N*-fenilpirimidin-2-amina y masa molar 225,29 g mol⁻¹. Es muy poco móvil en el suelo y se degrada rápidamente siendo su vida media de 24-59 días. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

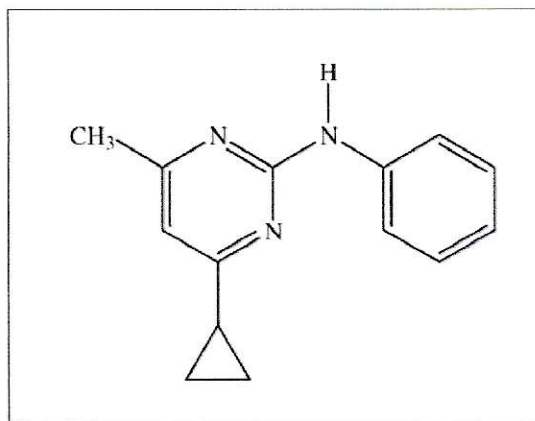


Fig. 4. Estructura molecular de Ciprodinil

- Diazinon

Es un insecticida que actúa por ingestión y por contacto, usado para controlar insectos en el suelo, en plantas ornamentales y en cosechas de frutas y hortalizas. Bloquea la acción enzimática de colinesterasa. Su nombre IUPAC es O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato y masa molar 304,35 gmol⁻¹. En suelo persiste poco tiempo y su movilidad es moderada, la cual depende del contenido de materia orgánica y carbonato de calcio. No se une fuertemente a las partículas y por ello puede lixiviarse hasta las aguas subterráneas. Su vida media en agua es de 5 a 15 días. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

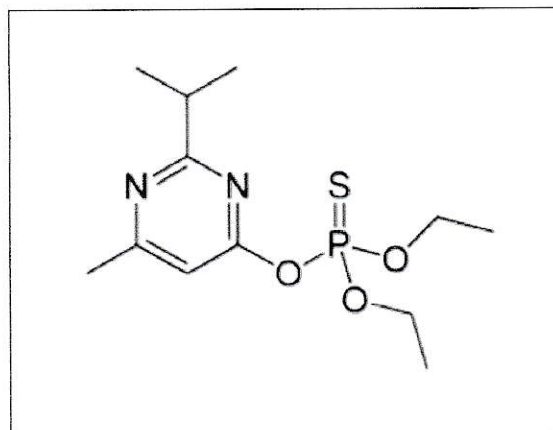


Fig. 5. Estructura molecular de Diazinon

- Clorpirifos

Es un insecticida que actúa por contacto, ingestión e inhalación. Su acción insecticida se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, lo que da lugar a la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las terminaciones nerviosas. Su nombre IUPAC es O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato y masa molar $350,62 \text{ g mol}^{-1}$. La volatilización es su principal ruta de disipación en el agua (vida media de 3,5 a 20 días). A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

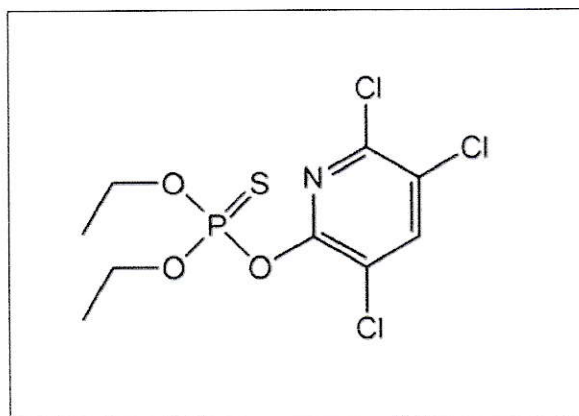


Fig. 6. Estructura molecular de Clorpirifos

- Azinfos etil

Es un insecticida y acaricida no sistémico de amplio espectro que actúa por ingestión y contacto inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa. Su nombre IUPAC es 3-(Dietoxifosfinotiolsulfanilmetil)-1,2,3-benzotriazin-4-ona y masa molar $345,38 \text{ g mol}^{-1}$. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

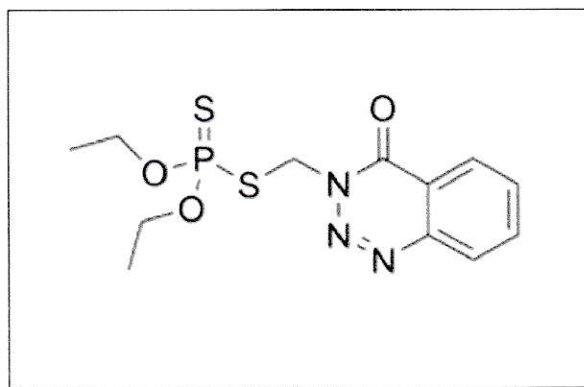


Fig. 7. Estructura molecular de Azinfos etil

- Sulfotep

Es un insecticida y acaricida no sistémico de amplio espectro que actúa por ingestión y contacto inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa. Su nombre IUPAC es *O,O,O',O'*-tetraetil ditiopirofosfato y masa molar $322,32 \text{ g mol}^{-1}$. Si se libera en el agua, Sulfotep se fijará a los sólidos en suspensión y sedimentos. La hidrólisis no se espera que sea un proceso importante ya que este compuesto sólo hidroliza en soluciones alcalinas. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

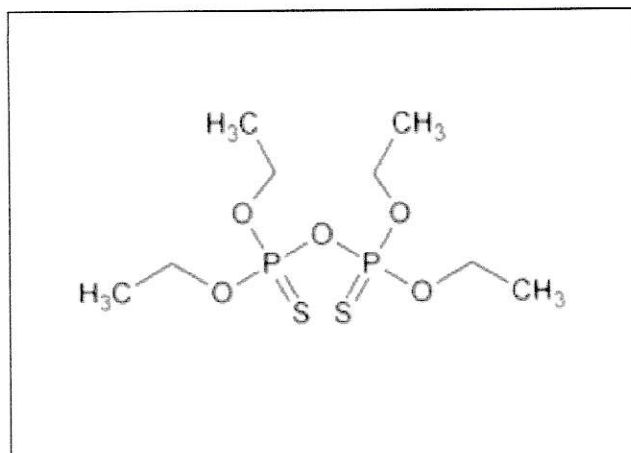


Fig. 8. Estructura molecular de Sulfotep

- Acrinatrin

Es un acaricida e insecticida que actúa por contacto e ingestión sobre huevos, larvas y adultos, de alta persistencia. Es neurotóxico para los ácaros, modifica el funcionamiento de una proteína de membrana celular responsable de conducir los impulsos nerviosos. Su nombre IUPAC es (S)-α-cyano-3-fenoxibencil (Z)-(1R,3S)-2,2-dimetil-3-[2-(2,2,2-trifluoro-1-rifluorometiletoxicarbonil)vinil]ciclopropanocarboxilato y masa molar 541,44 gmol⁻¹. Su vida media en el suelo es de unos 52 días en condiciones aerobias, además se adsorbe fuertemente, hasta un 99,8% y es inmóvil. Su vida media en el agua es de unos 7 días. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

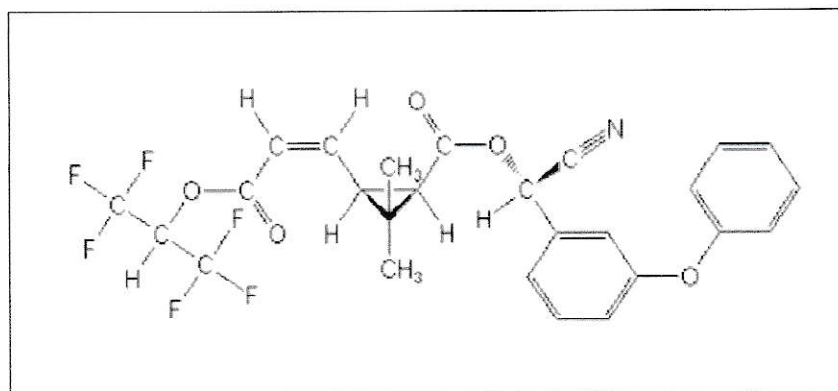


Fig. 9. Estructura molecular de Acrinatrín

- Esfenvalerato

Es un insecticida que actúa por contacto e ingestión, se destaca por su fuerte efecto de choque. Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de impulsos nerviosos. Su nombre IUPAC es (*S*)- α -ciano-3-fenoxibencil (*S*)-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato y masa molar 419,9 g mol⁻¹. Tanto en los cuerpos de agua como en los suelos húmedos es degradado por fotólisis (vida media de 20 días) y por hidrólisis. La velocidad de las reacciones de hidrólisis depende del pH, con una vida media de 16,3 días, 1,63 días y 3,9 h a pH 7, 8 y 9 respectivamente. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

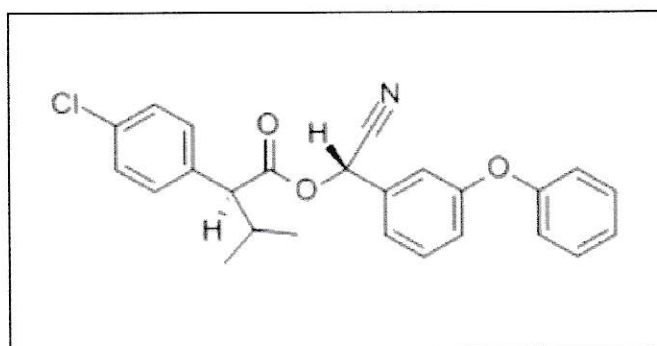


Fig. 10. Estructura molecular de Esfenvalerato

- Fenpropatrin

Es un insecticida y acaricida que actúa por contacto e ingestión, de gran efecto de choque y muy repelente. Su nombre IUPAC es (*S*)- α -ciano-3-fenoxibencil (*S*)-2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato y masa molar 349,43 g mol^{-1} . En los cuerpos de agua su hidrólisis puede ser significativa, sobre todo a pH básico (9) y temperaturas cálidas. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

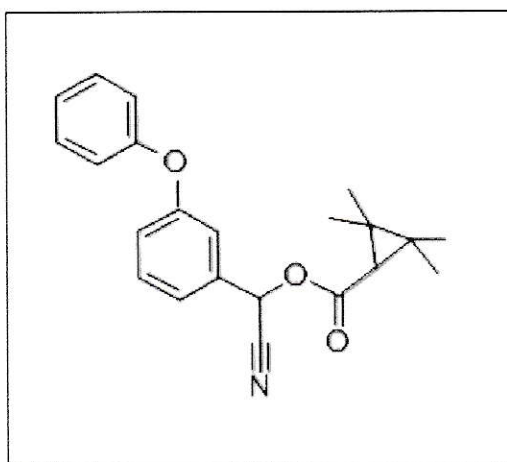


Fig. 11. Estructura molecular de Fenpropatrin

- Triadimefon

Es un fungicida sistémico, de acción preventiva, curativa y erradicante. Detiene el desarrollo de los hongos interfiriendo con la síntesis del ergosterol. Su nombre IUPAC es (RS)-1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ona y masa molar 293,75 g mol^{-1} . En agua es muy estable, no se hidroliza fácilmente y no se adsorbe a los sólidos suspendidos y sedimentos. A continuación, la figura que muestra la estructura del compuesto.

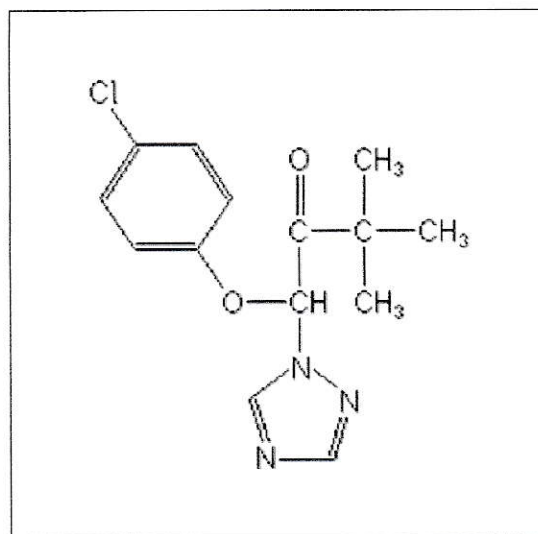


Fig. 12. Estructura molecular de Triadimefon

A continuación se presenta una tabla que resume los parámetros fisicoquímicos más relevantes de los 12 plaguicidas estudiados en las muestras de agua:

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de plaguicidas estudiados

Plaguicida	Fórmula	Log Pow	P _{vapor} (mPa)	Solubilidad (mgL ⁻¹)
Sulfotep	C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂	3,99	14	10
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	3,69	11,97	60
Clorotalonil	C ₈ Cl ₄ N ₂	2,94	0,076	0,81
Clorpirifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	4,7	1,43	1,05
Triadimefon	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	3,18	0,02	70
Ciprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	4	5,1 · 10 ⁻⁰¹	13
Captan	C ₉ H ₈ Cl ₃ NO ₂ S	2,5	0,0042	5,2
Kresoxym metil	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	3,4	2,3 · 10 ⁻⁰³	2
Fenpropatrin	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	6,04	0,76	0,33
Azinfos etil	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	3,18	0,32	4,5
Acrinatrín	C ₂₆ H ₂₁ F ₆ NO ₅	6,3	4,4 · 10 ⁻⁰⁵	0,002
Esfenvalerato	C ₂₅ H ₂₂ ClNO ₃	6,24	1,2 · 10 ⁻⁰⁶	0,001

1.4. Efectos en el Medio Ambiente

Al estudiar plaguicidas es necesario incorporar la dimensión ambiental, puesto que estas sustancias son aplicadas directamente en sistemas abiertos, que mantienen continua comunicación entre los diferentes subsistemas que componen el ecosistema: los suelos, la atmósfera, las aguas y la biota en general.

La interacción de un plaguicida con el medio ambiente dependerá casi exclusivamente de sus características fisicoquímicas particulares y de las condiciones que presente el entorno donde es aplicado, es decir, debemos considerar las variables ambientales predominantes: dirección de los vientos, temperatura ambiental, caudales presentes (con su respectivo análisis de volumen transportado y velocidades de los distintos regímenes) condiciones particulares de las aguas (temperatura, pH, conductividad eléctrica, sólidos disueltos, cantidad de materia orgánica presente, etc.), presencia de aguas subterráneas, tipos y perfiles de suelos en el entorno, entre otros factores importantes a ser considerados.

Dentro de las propiedades relevantes de los plaguicidas en su interacción con el medio ambiente destacan: persistencia, vida media, constante octanol/agua (K_{ow}), solubilidad y presión de vapor (Hidalgo C, 1999).

Los plaguicidas tienen la capacidad de desplazarse en los distintos sistemas; en la atmósfera el desplazamiento depende, además de la volatilidad de cada compuesto, de las velocidades de viento presentes en el sitio de aplicación, así como

de la dirección predominante ya que este factor determinará la zona hacia la cual la mayor concentración de plaguicida será desplazada.

En el suelo la movilidad dependerá de la cantidad de arcillas presentes, de la materia orgánica y la granulometría, entre otros factores; éstos interaccionan de distinto modo con los plaguicidas, por ejemplo si el plaguicida tiene afinidad con arcillas y el suelo de la zona de aplicación tiene una cantidad significativa de este componente, la molécula tenderá a mantenerse retenida por adsorción en el suelo (Sánchez M.J., 1984).

En el agua la movilidad del plaguicida dependerá principalmente de su vida media en el medio; cada plaguicida tiene condiciones de hidrólisis, fotólisis y catálisis biológica particulares, por tanto el plaguicida tendrá movilidad si tiene dificultad para ser degradado en el agua donde se encuentre (condiciones de pH, conductividad eléctrica, temperatura, DBO y DQO entre otros factores). Además es importante la relación entre columna de agua y el sedimento subyacente de la zona que reciba el plaguicida aplicado, dado que el intercambio de materiales entre ambos es continuo, pudiendo encontrarse plaguicidas tanto en el agua como en los sedimentos.

En la siguiente figura se muestra esquemáticamente el movimiento de los plaguicidas en el medio ambiente, sus vías de descomposición y posible acumulación en los distintos sistemas.

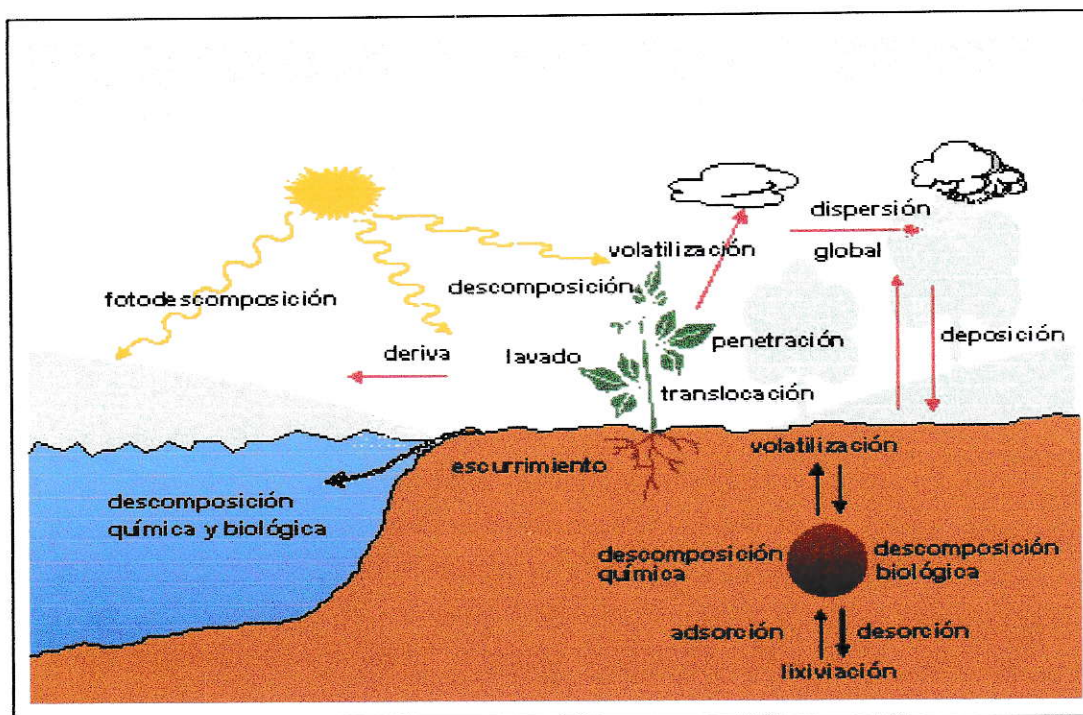


Fig. 13. Movimiento y destino de plaguicidas en el medio ambiente

1.5. Técnicas de Análisis

1.5.1. Cromatografía

La cromatografía es una técnica analítica de separación; se utiliza para la caracterización de mezclas complejas y tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Está basada en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido gas, líquido o fluido supercrítico, que moviliza a la muestra a través de una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido. Los

componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria o columna y la fase móvil a través de fuerzas intermoleculares como son las fuerzas de dispersión, interacción dipolo-dipolo inducido, puentes de hidrogeno e interacciones electrostáticas.

De este modo los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y esto va permitiendo la separación. Una vez separados son llevados al detector a través de un medio líquido o gaseoso, generando una señal específica para cada compuesto estudiado, que entrega información sobre la concentración y el tipo de compuesto existente en la muestra. El resultado gráfico de esta técnica analítica es llamado cromatograma, y se expresa en señal v/s concentración (Skoog, D.A., 1994).

1.5.2. **Cromatografía de Gases (GC)**

La cromatografía gaseosa es una técnica de separación de compuestos en la cual la muestra es volatilizada en una cámara con una temperatura al menos 50 °C más elevada que la temperatura de ebullición del compuesto menos volátil. Esta volatilización es brusca con el fin de disminuir el ancho de las bandas cromatográficas obtenidas, producto de la distribución normal de velocidad de las partículas inyectadas. La cantidad de muestra inyectada en este tipo de cromatografía es reducida, pensando también en que la volatilización sea rápida y completa. La fase móvil debe ser un gas inerte que, a diferencia de las otras técnicas cromatográficas, no interacciona con la columna ni con la muestra, y solamente la

transporta por arrastre. El gas portador debe cumplir una serie de requisitos para ser usado en GC:

- Ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria)
- Ser capaz de minimizar la difusión gaseosa
- Fácilmente disponible y puro
- Económico
- Adecuado al detector a utilizar

En este trabajo se utilizó un detector de captura de electrones (ECD) el que opera casi de la misma forma que un contador proporcional para la medida de radiación X. En este caso el efluente de la columna pasa sobre un emisor β , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o de titanio). Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador (con frecuencia se trata de nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones. De este proceso de ionización, en ausencia de especies orgánicas, resulta una corriente constante entre un par de electrodos. Sin embargo, la corriente disminuye en presencia de moléculas orgánicas con átomos electronegativos. La respuesta es poco lineal, a no ser que el potencial a través del detector se aplique en forma de impulsos (McNair y Miller, 1998).

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro; en cambio no es sensible a

grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos. Una aplicación importante del detector de captura de electrones es la detección y determinación de plaguicidas clorados.

Los detectores de captura de electrones son altamente sensibles y tienen la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia de otros detectores). Por otra parte, su intervalo lineal de respuesta normalmente se limita a unos dos órdenes de magnitud (Skoog, D.A., 1994).

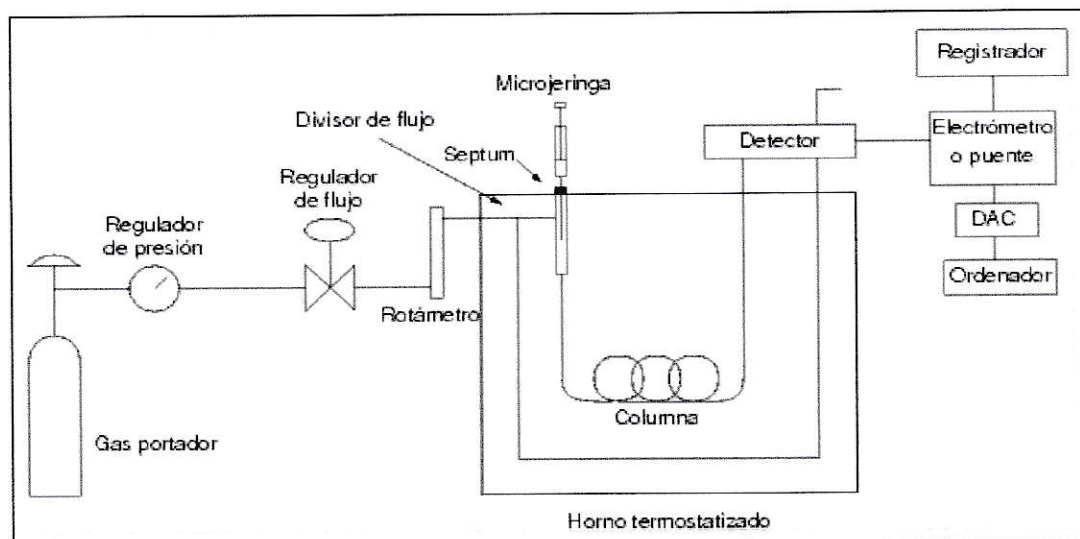


Fig. 14. Diagrama de un cromatógrafo de gases

1.5.3. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Se puede utilizar para identificar los diferentes elementos químicos que

forman un compuesto o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto (Bubbert, Jennet, 2002).

El acoplamiento de la técnica de espectrometría de masas a la cromatografía no tan sólo sirve como detector sino que también para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ión pasa cerca o golpea una superficie del detector durante su trayectoria y producirá un espectro de masa junto con un archivo de m/z en el cual los iones característicos del compuesto están presentes y dan cuenta de la identidad del analito. La identificación final se da por un conteo de las rupturas iónicas en las moléculas a lo largo del proceso, las que siguen el mismo patrón para un mismo compuesto o molécula. Los espectros de masas generados son comparados con bases de datos de compuestos puros contenidos en una “biblioteca” de compuestos con sus respectivos espectros.

Los espectros se generan por la ionización que sufren los compuestos orgánicos al ser sometidos a un haz de energía superior a su potencial de ionización (Watson, 1997), en donde se produce el ión molecular M^{+} debido a la pérdida de uno de los electrones de valencia, y es este ión molecular el que genera la masa molar del compuesto (Oriol y Del Castillo, 1998).

Luego de la etapa de ionización sigue una de aceleración, donde una fracción de los iones moleculares formados en la ionización, los que poseen generalmente carga positiva única, se transforma en un flujo de iones que adquiere una velocidad

producida por un campo magnético o eléctrico. Dado que la gran mayoría de las moléculas formadas son de carga positiva se puede lograr una dispersión efectiva de éstas, provocada por lo que se define como un analizador de masas, que utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera (Oriol y Del Castillo, 1998). La fuerza ejercida por los campos eléctricos y magnéticos es definida por la fuerza de Lorentz:

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$$

Donde **E** es la fuerza del campo eléctrico, **B** es la inducción del campo magnético, **q** es la carga de la partícula, **v** es su velocidad y **x** simboliza el producto cruz o producto vectorial. Todos los analizadores totales utilizan las fuerzas de Lorentz de una manera u otra en la determinación de la relación masa/carga, estática o dinámicamente. Los iones incorporan un campo magnético o campo eléctrico que dobla las trayectorias del ión dependientes en su masa y carga, desviando el traslado más rápido de iones más ligeros. Así, el analizador dirige las partículas al detector variando un campo eléctrico o magnético que se basa en el cociente masa/carga (*m/z*).

Cabe señalar que la espectrometría de masas es una herramienta eficiente para la comprobación de los analitos que se buscan en las muestras, pero este detector carece de alta sensibilidad comparado con otros detectores (Bubbert y Jennet, 2002).

1.5.4. Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido también se conoce como extracción con disolventes; consiste en la separación de los componentes de una solución líquida por contacto con otro líquido parcialmente insoluble. Si las sustancias que componen la solución original se distribuyen de manera distinta entre las dos fases líquidas se puede lograr cierto grado de separación, que puede incrementarse mediante el uso de contactos múltiples. En todas las operaciones de este tipo, la solución desde la cual se va a extraer el soluto deseado se llama *alimentación* (A + C) y *disolvente* (B) el líquido con el cual se pone en contacto la alimentación. El producto de la operación rico en disolvente se llama *extracto* (A + B), el líquido residual de donde se separó el soluto es el *refinado* (C). En el siguiente diagrama se muestra el proceso general de extracción líquido-líquido.

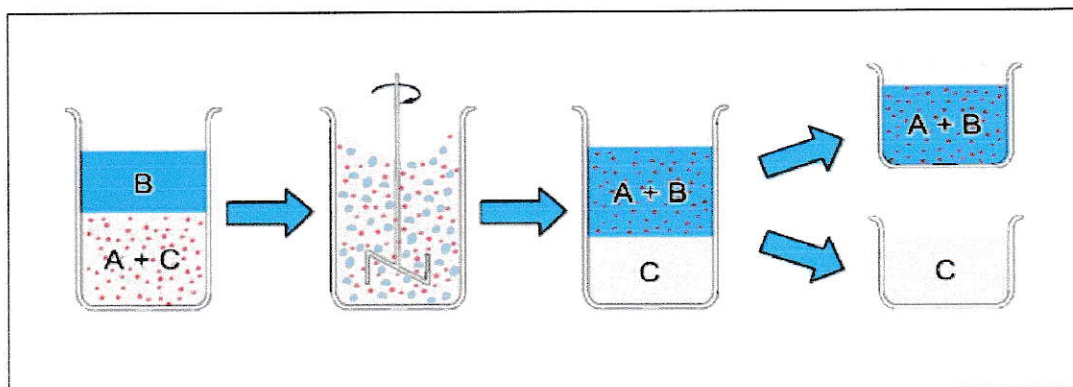


Fig. 15. Esquema general de extracción líquido-líquido

En el proceso de extracción hay factores que se deben considerar, entre ellos la solubilidad del o los analitos en estudio en cada uno de los líquidos inmiscibles que participan del proceso de extracción; para esto es necesario conocer valores de solubilidad en agua de cada uno de los componentes y además una constante

conocida como coeficiente de reparto (K), que indica la relación de cómo se reparte una determinada sustancia entre dos sustancias inmiscibles; esta constante se obtiene al medir la cantidad de analito que se disuelve en una fracción de octanol y la cantidad que se disuelve en agua estando los tres compuestos en contacto directo. A este estado o interacción de los tres compuestos del proceso se llama equilibrio ternario. La constante se denomina K_{ow} cuando la distribución es entre octanol y agua (octanol/water), la forma general es K_d la cual tiene un valor para cada compuesto con el respectivo solvente orgánico utilizado (Henley y Seader, 1988)

Como estos valores suelen ser altos para sustancias orgánicas se utiliza el valor del logaritmo de esta constante que también se denomina como P, el valor que se encuentra generalmente es el de $\log P$; mientras más grande sea este valor más lipofílica será la sustancia. Para sustancias insolubles en agua este valor es indeterminado por razones matemáticas (Henley y Seader, 1988).

1.5.5. **Microextractor**

La técnica de extracción utilizada en este trabajo de tesis se denomina Microextractor, y fue desarrollada por el científico y académico alemán Berthold Kettner en la primera mitad de los años 2000.

Es fundamentalmente una extracción líquido-líquido, aplicado a la extracción de plaguicidas desde una fase acuosa con otra orgánica, las que por agitación continua logran el traspaso de los plaguicidas desde una a otra fase. Transcurrido el tiempo necesario para observar la separación de fases, entra en juego el diseño del

Microextractor, que por adición de agua produce el desplazamiento de la fase orgánica fuera del sistema, la que es filtrada y rotavaporada para su concentración y posterior lectura en GC/MS.

La técnica Microextractor reemplaza al solvente diclorometano – comúnmente utilizado en extracciones líquido/líquido- por n-hexano, el cual es un solvente eficiente en la extracción de compuestos apolares ($\log P_{ow_{hexano}} = 3,9$; $\log P_{ow_{diclorometano}} = 1,25$; lo que indica la alta afinidad de n-hexano por compuestos apolares, en comparación con diclorometano), que además cuenta con la ventaja de ser menos nocivo para el ser humano y presentar una presión de vapor mucho menor a la del diclorometano en similares condiciones (diclorometano: 47,4 kPa; hexano: 17,3 kPa, ambos a 20 °C). Además, esta técnica utiliza menor volumen de extractante ya que necesita solamente 50 mL de hexano por cada litro de muestra de agua analizada, generando menores cantidades de desechos líquidos en el laboratorio y con ello hacia el medio ambiente.

El diseño del Microextractor, además de ser de bajo costo es sencillo y puede ser replicado con facilidad en talleres de vidrio, por lo que se puede disponer de una batería de ellos para realizar estudios de laboratorio con mayor rapidez y de este modo asegurar la reproducibilidad de los análisis. También cuenta con la ventaja de ser más independiente que el clásico embudo de decantación, que debe ser agitado continuamente exigiendo mayor atención por parte del analista y reduciendo la posibilidad de trabajar en simultáneo con varias extracciones; por el contrario, el

Microextractor si bien requiere cierto manejo del analista, es más sencillo de utilizar y permite el análisis en serie.

En la siguiente figura se muestra el equipo Microextractor y se enumeran sus partes más importantes:

1. Boquilla esmerilada que calza en la botella de 1L en la que se pone la muestra a extraer (Fig. 26)
2. Brazo inferior que, introducido en la muestra, hace ingresar agua que por desplazamiento hace salir a la fase orgánica que contiene el plaguicida
3. Brazo superior por el cual se hace ingresar suave y continuamente agua Mili-Q, que desplaza a la fase orgánica que contiene el plaguicida
4. Punto de separación: aquí el agua baja por el brazo inferior (2) y la fase orgánica sube por el interior del cuerpo central
5. Boquilla por la cual se puede introducir una varilla de vidrio delgada, para romper burbujas que frecuentemente se generan en el proceso de agitación (generación de emulsión)
6. Salida desde la cual se recolecta la fase orgánica antes desplazada desde la muestra

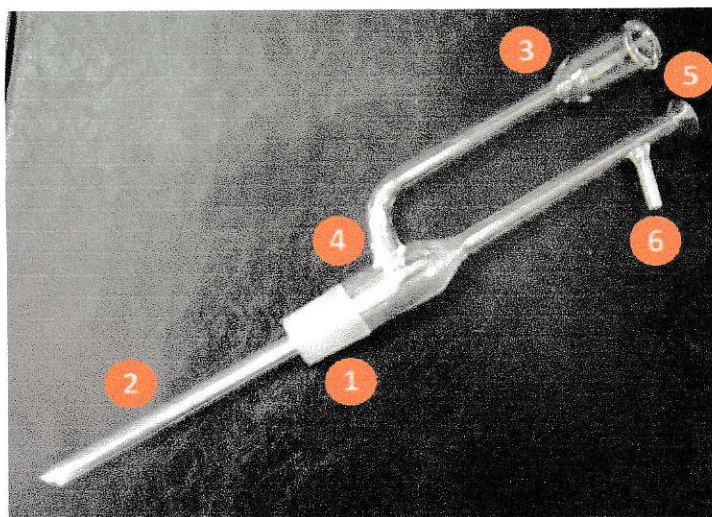


Fig. 16. Esquema que muestra partes importantes del Microextractor

El sistema se ensambla a una botella ámbar de 1 L con boca esmerilada, la que alberga la muestra en su interior, como se muestra en la siguiente figura (esto se desarrolla en materiales y métodos):

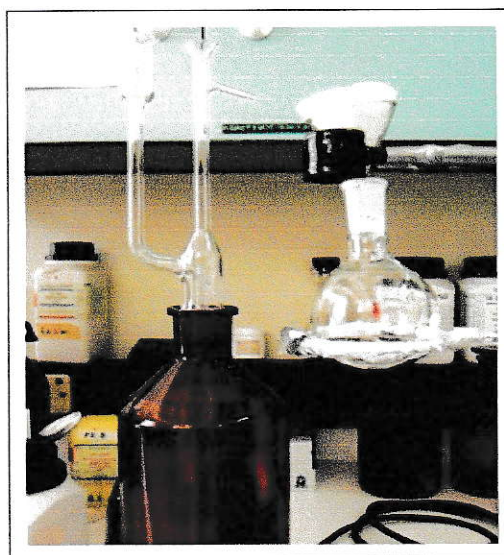


Fig. 17. Montaje del sistema Microextractor

1.6 HIPÓTESIS

Con el sistema Microextractor como técnica de extracción líquido/líquido es posible realizar la extracción de residuos de plaguicidas en la matriz agua, para su posterior análisis en Cromatografía Gaseosa con Espectrometría de Masas y Micro ECD.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo General

- Identificar los plaguicidas en muestras de agua de una zona vitivinícola de la VI Región de Chile mediante extracción líquido/líquido utilizando un Microextractor y posterior cuantificación en GC/MS y Micro ECD.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para el análisis y cuantificación de los plaguicidas en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas.
- Cuantificar los plaguicidas detectados en las muestras de agua recolectadas en la zona de estudio.
- Analizar la eficiencia del Microextractor como sistema de extracción de plaguicidas desde una matriz de agua.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de las Muestras de Aguas

Las muestras de aguas que se utilizaron en este estudio fueron recolectadas en la localidad de Apalta, comuna de Santa Cruz, VI región. Los cursos de agua estudiados corresponden a canales de riego de predios agrícolas dedicados al cultivo de vides para la producción de vino, pertenecientes a la Viña Ventisquero.

Las muestras fueron recolectadas en botellas ámbar de 4 litros que contuvieron acetona Suprasolv Merck, con tapa con sello de teflón y debidamente rotuladas. Además se realizaron análisis *in-situ* de las aguas estudiadas: conductividad eléctrica, medición de pH, temperatura.

Para asegurar su mantención hasta la llegada al laboratorio donde se realizaron los análisis, se introdujo las muestras en *coolers* con hielo para mantener la temperatura a menos de 10 °C. Al llegar al laboratorio se trasladaron las muestras a refrigeradores programados a 4 °C donde se conservaron hasta su tratamiento pre-análisis e inyección en GC el 28 de diciembre de 2010.



Fig.18. Recolección de muestras

2.2. Puntos de Muestreo

Los puntos de muestreo escogidos son tres, y básicamente fueron seleccionados a petición de la propia viña, ya que son las aguas que utilizan para riego y que se encuentran en la zona de estudio:

- **P0 (Punto Cero):** se trata de un punto alejado de la intervención agrícola de la viña, por lo que es tomado como punto referencial, Fig. 19.



Fig. 19. Punto de muestra P0

- **PE (Punto Estanque):** se trata de un estanque de almacenamiento de aguas para el riego en época primavera-verano. Se alimenta principalmente del Río Tinguiririca y de canales aledaños, Fig. 20.

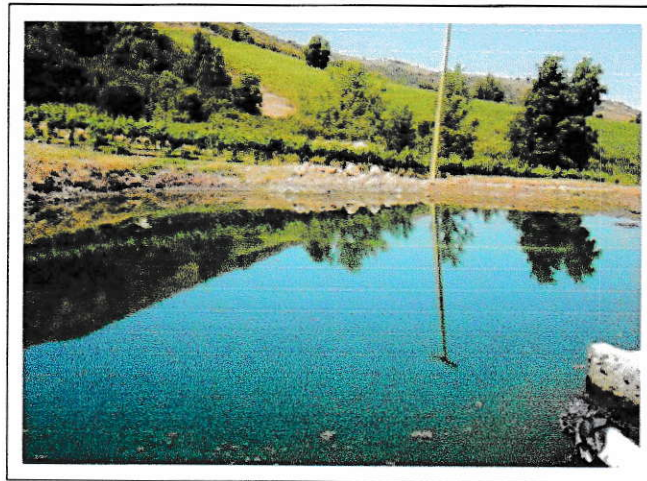


Fig. 20. Punto de muestreo PE

- **RT (Río Tinguiririca):** este punto está ubicado en medio del cauce del río, esto debido a que aguas abajo se encuentra una bomba extractora de agua que sirve para regadío de los predios, Fig. 21.



Fig. 21. Punto de muestreo RT

Como referencia espacial, en la siguiente figura se muestra una foto satelital de los puntos de muestreo, obtenida con el software Google Earth.



Fig. 22. Foto satelital de puntos de muestreo

2.3. Preparación de los Estándares

Los estándares fueron disueltos cada uno por separado en acetona (Merck Suprasolv), en concentraciones alrededor de los $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (soluciones *madre* o iniciales), los que fueron conservados a menos de $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2 de los 22 plaguicidas en estudio (Sulfotep y Diazinon) están en forma líquida por lo que fueron sacados con cuidado de las ampollas que los contenían y se cuidó el minucioso lavado de las ampollas con solvente para arrastrar todo su contenido y así asegurar la concentración de las soluciones iniciales.

2.4. Determinación de los Tiempos de Retención (t_r)

De las soluciones iniciales se prepararon soluciones de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, usando esta vez como solvente n-hexano (Merck Suprasolv), pues este es el solvente utilizado en la extracción líquido/líquido y fueron analizados en el cromatógrafo de gases (GC Agilent 6890) usando un detector de captura de electrones (μECD , Electron Capture Detector) y para su comprobación con un detector de masas (Agilent 5975B).

2.5. Creación de una Biblioteca en GC/MS

El cromatógrafo utilizado tiene la característica de permitir la creación (además de poseer una propia) de una biblioteca de iones moleculares característicos de compuestos para que sean identificados por el espectrómetro de masas. A cada plaguicida se le asignan valores de t_r encontrados, como también de los iones moleculares que se generan al bombardear las moléculas con luz radiante y así provocar su ionización. De este modo, al inyectar una molécula desconocida, se le puede comparar con los compuestos ingresados a la biblioteca creada en este trabajo junto con la que posee el equipo por defecto, y por porcentaje de coincidencia de sus iones moleculares (que son siempre iguales para cada compuesto) son identificados y posteriormente cuantificados por curvas de calibración.

2.6. Parámetros Instrumentales en GC

En el estudio de plaguicidas por GC/MS es necesario programar el equipo con parámetros instrumentales que permiten la separación óptima de compuestos y así mejorar la resolución de los peaks cromatográficas, que luego sirven como huella

de identificación y cuantificación. Los parámetros instrumentales utilizados en este estudio fueron:

- Inyección: 1 μL , splitless
- T° cámara de inyección: 250 °C
- Gas portador: Helio 99,9995% de pureza
- Flujo: 7,3 mL/min
- Rampla de temperatura: desde 60 hasta 290 °C
- Columna de fenil metil siloxano, 30 m x 250 μm x 0,25 μm de diámetro nominal

2.7. Determinación de los Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se realizaron mediciones en la parte inferior del rango lineal de la curva de calibración. Se graficaron las concentraciones del analito versus la respuesta (área del pico) promedio y se determinó la ecuación de esta recta, obteniendo de ella una estimación de la respuesta del blanco: Y_{bl} , que corresponde al intercepto de la curva de la zona baja. Posteriormente se obtuvo una segunda curva, graficando concentración de analito versus desviación estándar de las respuestas; de la ecuación de esta recta se obtuvo una estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bl} , cuyo valor corresponde al intercepto de esta segunda curva (Mennickent y col, 2000).

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon mediante las ecuaciones: límite de detección = $\frac{y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$; límite de cuantificación = $\frac{y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$ donde “b” es la pendiente de la curva de calibración inicial (Proakis y Manolakis, 1998).

2.8. Extracción con Microextractor

A continuación se detalla la metodología para el uso del Microextractor en la extracción de plaguicidas desde una muestra de agua:

- a) La muestra de agua se debe filtrar con microfibras de vidrio para eliminar todo tipo de impurezas tales como pequeñas algas, sedimentos y sólidos suspendidos (Whatman, 2,7 μ m)
- b) En un matraz de aforo se mide 1L de la muestra de agua a analizar
- c) Se adiciona la muestra a la botella ámbar con boca esmerilada (Fig. 26)
- d) Se agregan 20 g de NaCl (Merck) a la muestra y se agitan en agitador orbital hasta disolución de la sal
- e) Se adicionan 50 mL de n-hexano (Merck Suprasolv) y se agita en agitador orbital durante 15 min
- f) Se deja reposar la muestra durante 10 min para que se separen las fases
- g) Se monta el Microextractor sobre la botella ámbar, cuidando de encajar bien los esmerilados
- h) Se agrega cuidadosamente agua Mili-Q por el brazo superior (Fig. 26) para comenzar a desplazar la fase orgánica hacia la salida del Microextractor

- i) Se recolecta la fase orgánica en un balón filtrándola previamente con papel filtro (Whatman 42) y sulfato anhidro (Merck) para retener el agua que pudiera haber salido junto con la fase orgánica
- j) Se lava el filtro 10 veces con n-hexano al balón con la muestra para arrastrar todo el plaguicida que pudiera haber quedado retenido
- k) Se adicionan dos pipetas Pasteur de isooctano (Merck Suprasolv) –que tiene un punto de ebullición mayor al de n-hexano- y se rotavapora hasta aproximadamente 2 mL
- l) Se extrae el remanente desde el balón con pipeta Pasteur y se lleva con cuidado a un matraz de aforo de 10 mL, el que se afora con n-hexano
- m) La muestra se lleva a un vial y se lee en el cromatógrafo de gases

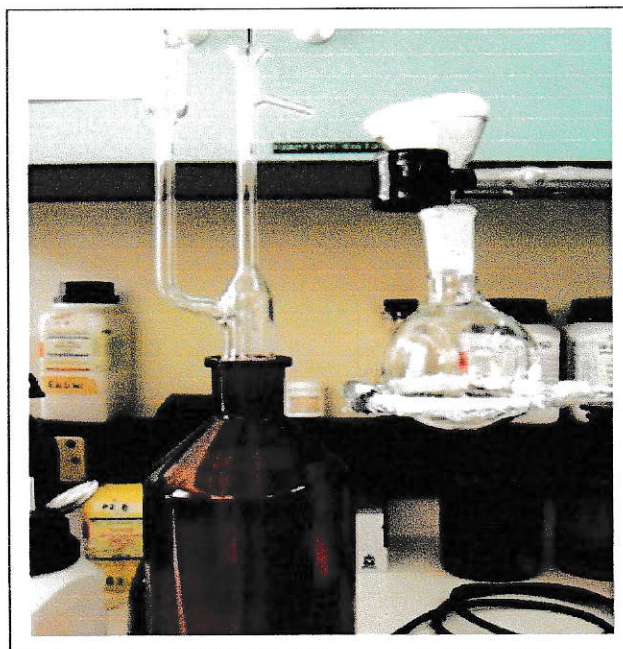


Fig. 23. Montaje del sistema de extracción

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de los Tiempos de Retención (t_r)

Los tiempos de retención encontrados para cada plaguicida se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Tiempos de retención (min) de los plaguicidas estudiados

Plaguicida	t_r (min)	Plaguicida	t_r (min)
Sulfotep	17,177	Captan	23,353
Diazinon	19,187	Kresoxym metil	25,633
Clorotalonil	19,393	Fenpropatrin	29,313
Clorpirifos	22,201	Azinfos etil	31,030
Triadimefon	22,297	Acrinatrín	31,158
Ciprodinil	22,960	Esfenvalerato	34,910

Para encontrar estos tiempos de retención se inyectó $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada plaguicida por separado y se obtuvo cromatogramas bien definidos, con *peaks* de buen tamaño, sin deformaciones y sin interferentes. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido para la determinación de t_r :

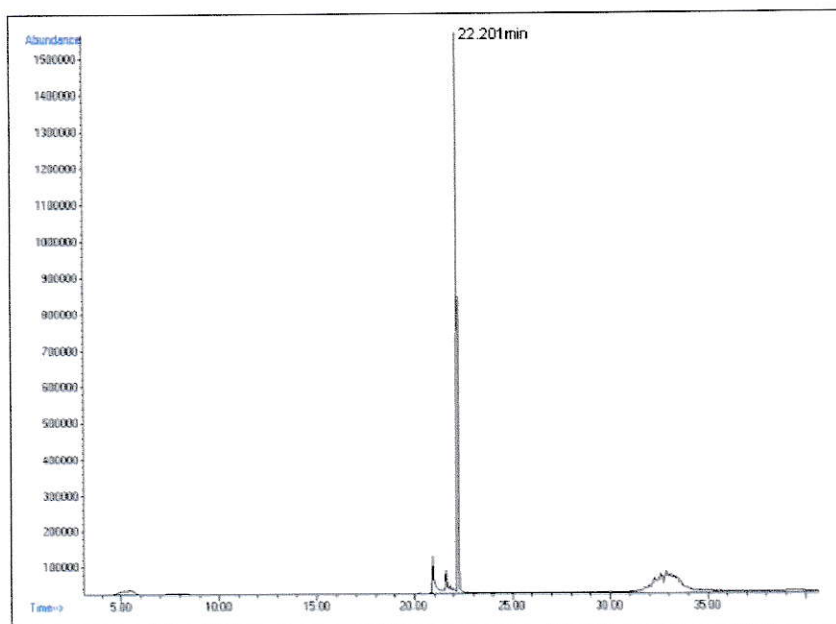


Fig. 24. Cromatograma de Clorpirifos 1 mgL⁻¹

3.2 Identificación de Compuestos por MS

Cada plaguicida estudiado fue identificado mediante espectrometría de masas, apoyando la identificación en la biblioteca de compuestos que posee el cromatógrafo de gases, además de la creada para el presente trabajo las que por porcentaje de coincidencia de los fragmentos iónicos, arrojan la identidad del compuesto analizado. Las muestras fueron de plaguicidas individuales, en un mismo día, con dos inyecciones por muestra y análisis en duplicado de cada una.

A continuación se muestran algunas imágenes a modo de ejemplo arrojadas por la biblioteca, que evidencian la presencia del plaguicida esperado en las muestras analizadas, y se destaca además el porcentaje de coincidencia:

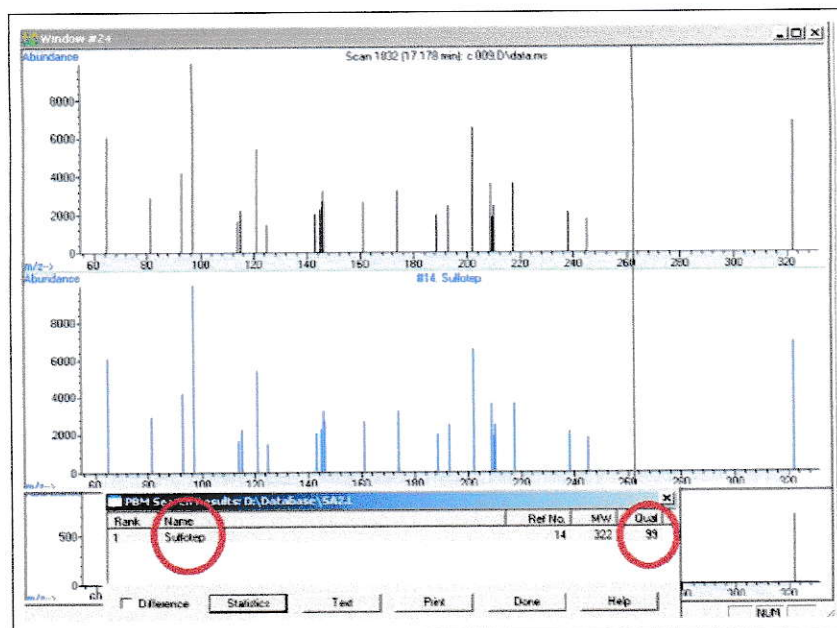


Fig. 25. Espectro de masa de Sulfotep

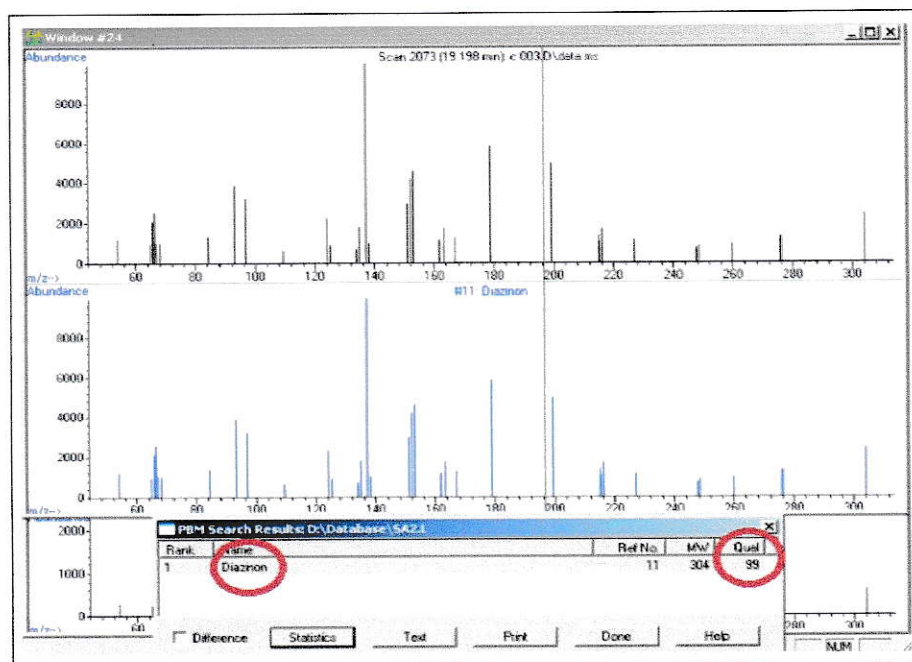


Fig. 26. Espectro de masa de Diazinon

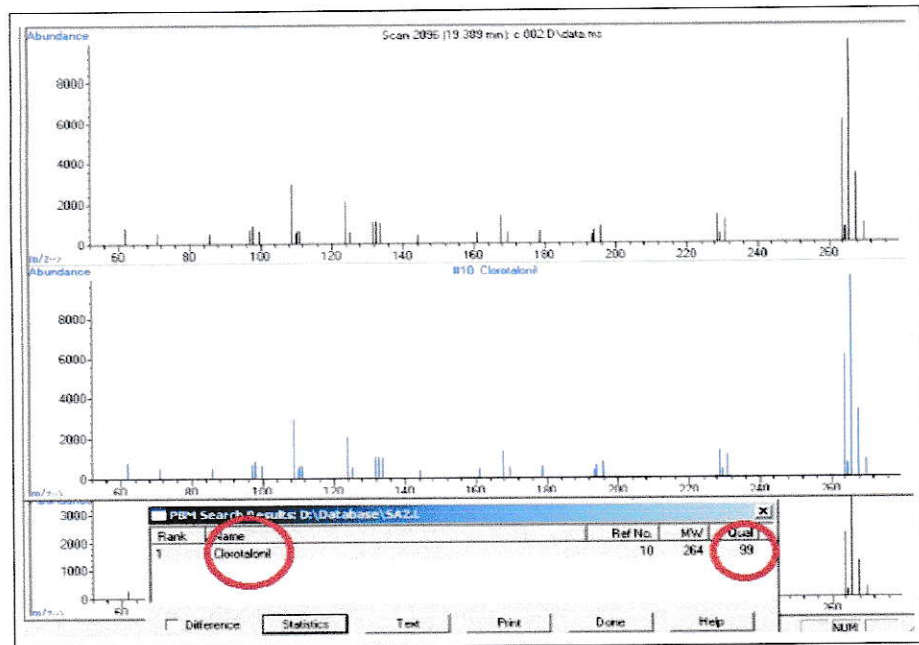


Fig. 27. Espectro de masa de Clorotaloni

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de coincidencia arrojados en la identificación de compuestos mediante espectrometría de masas para los 12 plaguicidas estudiados en las muestras de agua de la Viña Ventisquero:

Tabla 4. Coincidencia porcentual de plaguicidas estudiados

Compuesto analizado	Porcentaje de coincidencia (%)
Sulfotep	99
Diazinon	99
Clorotalonil	99
Clorpirifos	95
Triadimefon	91
Ciprodinil	64
Captan	74
Kresoxym metil	93
Fenpropatrin	72
Azinfos etil	91
Acrinatrín	86
Esfenvalerato	93

Se puede observar de esta tabla que exceptuando a Ciprodinil, Captan, Fenpropatrin y Acrinatrin, los plaguicidas son reconocidos con un porcentaje mayor al 90%, criterio mínimo de aceptación en el reconocimiento por espectrometría de masas usado en este seminario, por lo que no son incluidos en el análisis de las muestras de agua recolectadas en la Viña Ventisquero.

3.3 Curvas de Calibración

Se realizaron inyecciones múltiples (los 22 plaguicidas juntos) previas a las curvas de calibración definitivas (las curvas previas fueron realizadas sin extracción de por medio), con el fin de observar la resolución de los cromatogramas y determinar de esta manera si era posible estudiarlos juntos o si existía incompatibilidad por superposición picos cromatográficos o interferencia entre compuestos.

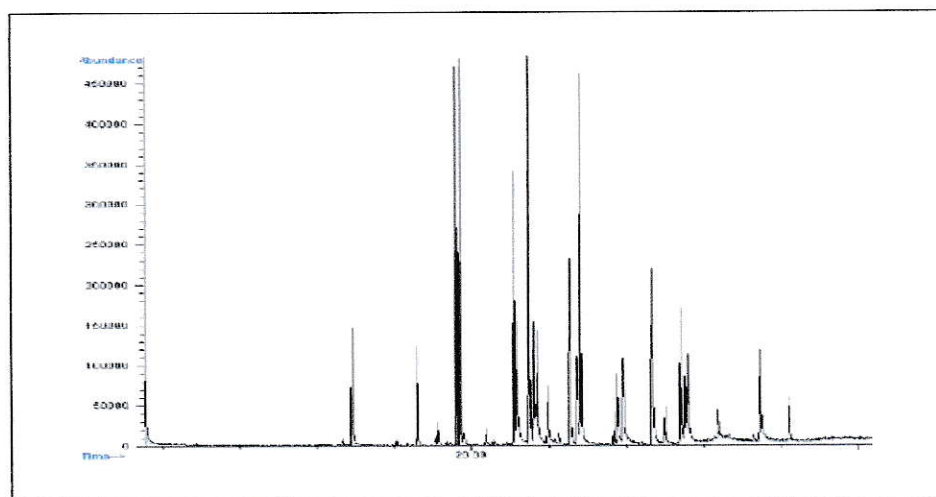


Fig. 28. Cromatograma múltiple de plaguicidas

Como se observa en la figura, los picos tienen buena resolución y no hay sobreposición entre señales. De esto se desprende que no existen impedimentos para analizar de forma simultánea la serie de plaguicidas, por lo que se comenzó a trabajar en inyecciones de concentraciones múltiples (todos los plaguicidas juntos en una solución inyectada) de la que se elaboran las curvas de calibración para cada compuesto.

Se crearon cuatro curvas de calibración distintas para cada plaguicida (cada curva fue creada en base a la precedente) con el fin de ajustar las concentraciones mínimas de trabajo, las que dependen de la sensibilidad del detector utilizado en el cromatógrafo de gases. También se buscó encontrar el rango óptimo de concentraciones de cada plaguicida para obtener la mejor curva que represente matemáticamente la relación existente entre la señal arrojada por el cromatógrafo y la concentración real del plaguicida en solución.

3.4 Curva de Calibración utilizando Microextractor

Habiendo encontrado los rangos de concentraciones óptimas para cada plaguicida, se realizaron dos ensayos de la técnica de extracción Microextractor en muestras de concentraciones múltiples creadas en base al trabajo de las curvas de calibración sin extracción del punto 4.3, y se llegó a que en la construcción de la curva de calibración con extracción no se incluirían los 22 plaguicidas iniciales, esto debido a causas tales como:

- No todos los plaguicidas incorporados en el estudio eran extraídos con n-hexano mediante el uso de la técnica Microextractor
- Debido a las bajas concentraciones a las que se llegó con los consecutivos ajustes (4 curvas iniciales) algunos compuestos dejaron de ser detectados por el detector μ ECD (más aun por el detector de masas, que tiene menor sensibilidad)
- Por la razón anterior los picos cromatográficos de algunos plaguicidas perdieron su calidad, mostrando frentes y colas grandes, además de simetría irregular

Por las razones expuestas anteriormente se decidió realizar una reestructuración al listado de los 22 plaguicidas incluidos en un comienzo y se redujo éste a 12 plaguicidas, los que serán revisados más en detalle al inicio de este trabajo.

Las curvas de calibración se construyeron con seis puntos de concentraciones crecientes, realizando tres extracciones por punto y leyendo en duplicado en el cromatógrafo, por lo que se obtuvo seis datos de áreas por cada uno de los puntos; con esto se realizó un trabajo estadístico en el cual se eliminaron hasta dos valores de área por punto (no más de dos, para no reducir el espacio muestral), discriminando a aquellos que salían de los límites inferior y superior de datos definidos por las ecuaciones:

$$L_{inf} = X - SD$$

$$L_{sup} = X + SD$$

Donde X es promedio, y SD desviación estándar.

A continuación se muestra un ejemplo del tratamiento estadístico para un plaguicida, utilizando el criterio antes mencionado:

Tabla 5. Datos depurados de áreas de Sulfotep

Concentración (mgL⁻¹)	x 1	x 1dup	x 2	x 2dup	x 3	x 3dup
0,01	255	252	134	252	250	311
0,02	419	469	553	501	484	542
0,04	946	1051	876	1038	885	900
0,06	1681	1691	1747	2046	2230	2073
0,08	2270	3015	2725	2713	2611	2590
0,1	3391	3779	3642	3637	3977	4060

De esta tabla se calculó el promedio y la desviación estándar y utilizando las ecuaciones de L_{inf} y L_{sup} se obtuvo el rango donde los valores deben encontrarse, según los cuales se eliminaron los datos tachados de la tabla anterior. En la siguiente tabla se muestran los resultados de promedio (\bar{X}), desviación estándar (SD), límites del rango de datos aceptables y el coeficiente de variación (CV) (que se calcula con los datos ya tratados) resultante de la ecuación:

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} * 100$$

Tabla 6. Tratamiento estadístico de Sulfotep

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,01	242	2	1	184	300
0,02	495	32	6	446	544
0,04	949	31	3	871	1027
0,06	1911	195	10	1677	2145
0,08	2654	69	3	2412	2896
0,1	3748	160	4	3502	3994

De la tabla anterior se puede destacar que los valores obtenidos para el coeficiente de variación (CV) no superan el 10%, que es el valor que para este estudio se propone como máximo para aceptar como válidos los datos obtenidos para las curvas de calibración. Los coeficientes de variación que validan los datos obtenidos son expuestos en el Anexo A.

A continuación se muestra una tabla que contiene las ecuaciones de las curvas de calibración (con proceso de extracción) obtenidas para cada plaguicida, junto con su coeficiente de correlación:

Tabla 7. Ecuación y coeficiente de correlación de los 12 plaguicidas

Plaguicida	Ecuación	Coefficiente de correlación
Sulfotep	$y = 38703x - 333,17$	0,9907
Diazinon	$y = 8E+06x + 18962$	0,9978
Clorotalonil	$y = 3E+07x - 44710$	0,9815
Clorpirifos	$y = 5E+07x + 264113$	0,9942
Triadimefon	$y = 2E+07x - 15661$	0,9987
Ciprodinil	$y = 60050x + 123,23$	0,9814
Captan	$y = 2E+06x - 21994$	0,9803
Kresoxym metil	$y = 3E+07x + 59649$	0,9982
Fenpropatrin	$y = 3E+07x + 65842$	0,9979
Azinfos etil	$y = 3E+06x - 46907$	0,9715
Acrinatrín	$y = 4E+07x + 140024$	0,9955
Esfenvalerato	$y = 4E+07x + 98992$	0,9956

Se puede observar de la tabla anterior que la mayoría de los compuestos estudiados exhiben coeficientes de correlación igual o mayor a 0,995, que se acercan a un valor perfecto de correlación; se asume como un buen valor al que se encuentra entre 0,995 y 1 (Gallego, 1995); sin embargo los valores que se escapan por debajo de esta clasificación son igualmente considerados como válidos para el estudio de la concentración de plaguicidas en muestras reales de agua. Por otra parte, Clorotalonil, Ciprodinil, Captan y Azinfos etil muestran valores que pueden no ser considerados como adecuados, pero son respaldados por los bajos coeficientes de variación (%CV) calculados para la construcción de sus respectivas curvas de calibración, por lo que son igualmente considerados como aceptables (Tablas adjuntas en Anexo A).

A continuación se muestran algunos gráficos de las curvas con extracción obtenidas para los plaguicidas en estudio:

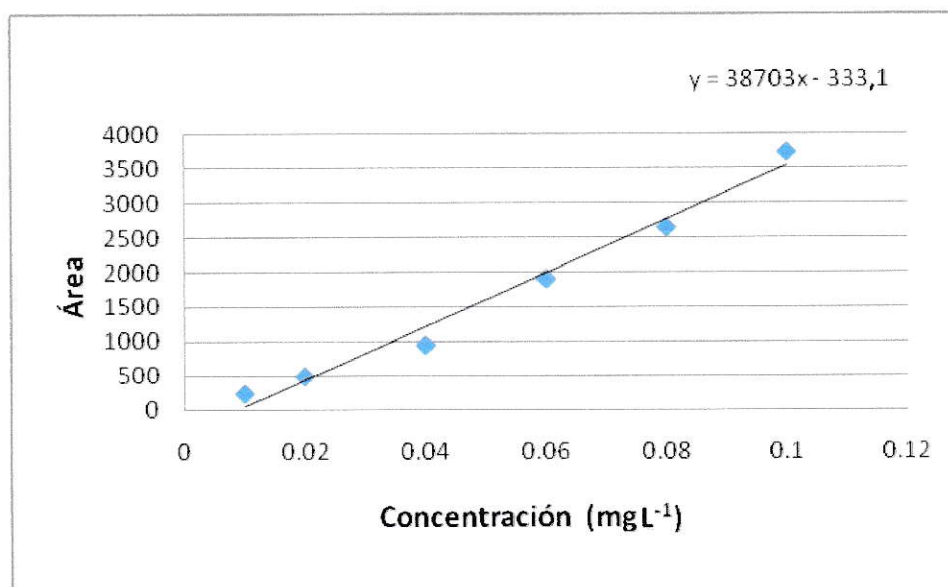


Fig. 29. Curva de calibración de Sulfotep

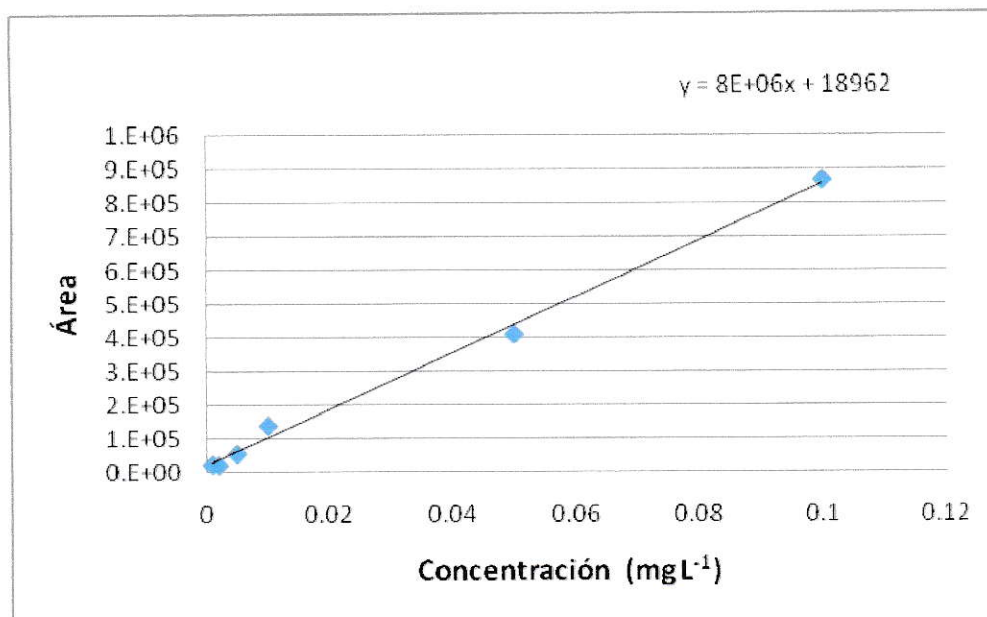


Fig. 30. Curva de calibración de Diazinon

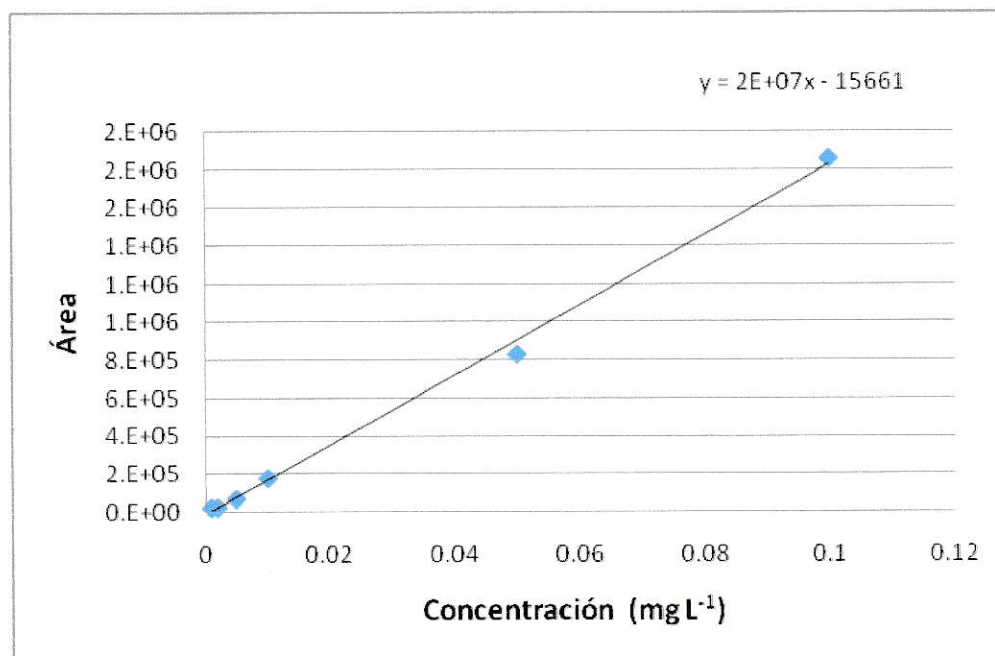


Fig. 31. Curva de calibración de Triadimefon

3.5 Eficiencia del Sistema de Extracción Microextractor

De la elaboración de curvas con y sin extracción se determinó la eficiencia porcentual de la extracción de plaguicidas realizada con el sistema Microextractor, la que se calculó según:

$$Eficiencia (\%) = \frac{\text{área con extracción}}{\text{área sin extracción}} * 100$$

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la eficiencia de extracción, la que fue calculada para cada punto de la curva, además de la eficiencia promedio del proceso, calculada como el promedio de todos los estándares de cada plaguicida:

Tabla 8. Eficiencias (%) de la extracción de plaguicidas

Plaguicida	St1 (%)	St2 (%)	St3 (%)	St4 (%)	St5 (%)	St6 (%)	X (%)
Sulfotep	71	63	80	81	83	82	77
Diazinon	132	56	66	70	75	81	80
Clorotalonil	99	65	95	61	65	58	74
Clorpirifos	103	87	83	80	89	92	89
Triadimefon	78	30	36	29	37	37	41
Ciprodinil	90	32	60	42	61	47	55
Captan	55	42	52	31	37	31	41
Kresoxym m.	92	72	83	68	78	83	79
Fenpropatrin	92	78	81	77	80	83	82
Azinfos etil	----	70	57	56	54	52	58
Acrinatrín	----	79	84	67	75	79	77
Esfenvalerato	81	79	79	67	77	83	78

Se considera como un rango aceptable de eficiencias al comprendido entre un 80 y un 120%; por lo que vemos la mayoría de los plaguicidas estudiados presentan eficiencias que bordean el 80% por lo que son considerados como aceptables (la forma de calcular la eficiencia se muestra en el Anexo B). Se observan valores bajos de rendimiento para los compuestos: Triadimefon, Ciprodinil, Captan y Azinfos etil; las razones por las cuales se puede estar produciendo este efecto y que pueden afectar en conjunto o por separado, son:

- Los plaguicidas con bajos valores de eficiencia tienen bajos coeficientes de reparto octanol/agua ($\log Pow$) en comparación con compuestos como Clorpirifos y Fenpropatrin, que tienen tanto eficiencias como coeficientes de reparto elevados. Esto implica que los compuestos que tienen bajo $\log Pow$ tienen menor afinidad por solventes apolares como n-hexano, por tanto su solubilidad será menor. En la siguiente tabla se muestran los valores comparativos:

Tabla 9. Eficiencias y $\log Pow$ de plaguicidas

Plaguicida	Eficiencia Promedio (%)	$\log Pow$
Triadimefon	41	3,11
Ciprodinil	55	3,9
Captan	41	2,35
Azinfos etil	58	3,18
Clorpirifos	89	4,96
Fenpropatrin	82	5

- Al aumentar la concentración en los estándares (desde St 1 al St 6) los compuestos experimentan una “competencia” por el solvente, ya que se encuentran todos en un volumen fijo, que considera las concentraciones de cada plaguicida como si estuvieran de forma individual (no se consideran interacciones entre plaguicidas). En el siguiente gráfico se muestra la tendencia a reducir la eficiencia de extracción en cada estándar a medida que aumenta la concentración:

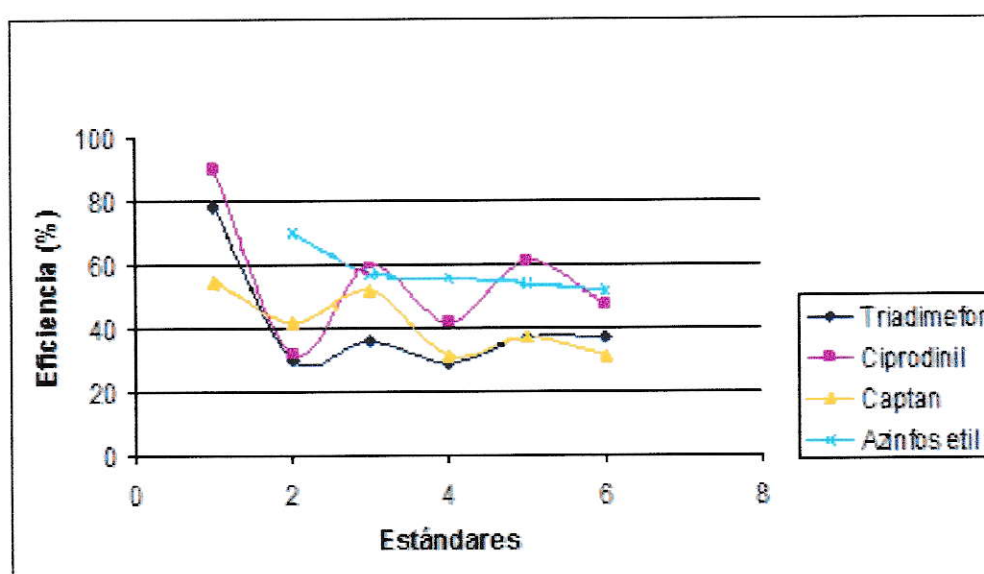


Fig. 32. Comportamiento de la eficiencia

3.6 Determinación de los Límites de Cuantificación (LC) y Detección (LD)

Para obtener estos valores se realizaron gráficos de las zonas bajas de cada curva de calibración de los plaguicidas que continúan en estudio -lista de 12 en vez de los 22 iniciales-. (La manera de calcular estos parámetros se encuentra en Materiales y Métodos y es detallada en el Anexo B). A continuación se muestran los

gráficos de la zona baja de Sulfotep, tanto de Concentración v/s Área y de Concentración v/s SD, de los cuales se extraen los valores necesarios para los cálculos:

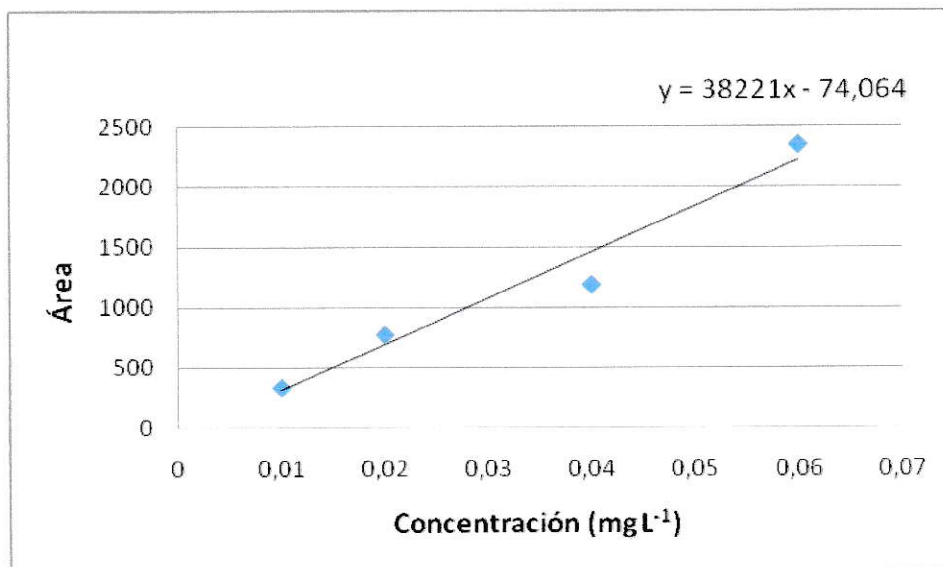


Fig. 33. Curva de calibración de Sulfotep

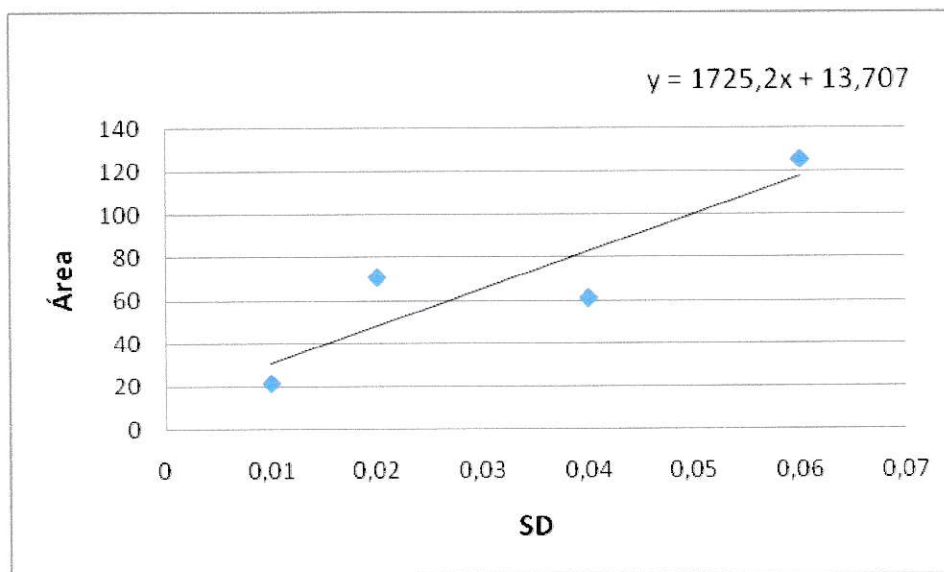


Fig. 34. Concentración v/s SD de Sulfotep

El mismo procedimiento se realizó con los restantes plaguicidas y los resultados para los LD y LC se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. LD y LC de plaguicidas

Plaguicida	LD (μgL^{-1})	LC (μgL^{-1})
Sulfotep	2,5	4,6
Diazinon	5,0	0,6
Clorotalonil	4,8	7,8
Clorpirifos	1,1	2,2
Triadimefon	1,2	1,3
Ciprodinil	4,0	5,6
Captan	5,2	5,8
Kresoxym m.	0,7	1,3
Fenpropatrin	0,6	1,0
Azinfos etil	16,7	19,6
Acrinatrín	7,4	10,5
Esfenvalerato	2,1	3,1

En la tabla anterior se puede ver que los valores obtenidos son bajos; en general del orden de los ppb (μgL^{-1}) y esto se debe principalmente a que el cromatógrafo de gases utilizado posee un detector μECD que tiene una alta sensibilidad, incluso en bajas concentraciones. Además este resultado está relacionado con las características moleculares de cada plaguicida y su compatibilidad con el detector. Los compuestos con centros electronegativos y anillos aromáticos con posibilidad de deslocalización electrónica son mejor detectados; caso contrario es el de compuestos como Azinfos etil, perteneciente a la familia de organofosforados, que por su estructura tienen menor probabilidad de ser detectados mediante Captura de Electrones.

3.7. Resultados en Muestras de Agua

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el análisis de muestras de agua recolectadas en la Viña Ventisquero, VI Región de Chile.

3.7.1. Parámetros *In-situ*

Los resultados de parámetros *in-situ* se resumen según la campaña de muestreo en la que fueron tomadas las muestras -cuatro en total-, durante el año 2010.

Tabla 11. Parámetros *in-situ* Primera Campaña: 30 de junio, 2010

Punto de muestreo	CE ($\mu\text{S/cm}$)	pH	°C	Hora
P0	90,7	6,35	7,3	10:30
PE	271	6,85	13,9	12:25
PR	334	7,09	10,2	13:30

Los datos de conductividad eléctrica son consecuentes con las características de cada sitio, el Punto 0 presenta baja conductividad pues es un punto alto de la viña, de aguas muy claras y con muy pocos sólidos disueltos, situación contraria a la del PE y PR, los que tienen gran cantidad de sólidos disueltos y otros componentes como materia orgánica (en el caso de PR). Los valores de pH son medianamente constantes entre puntos, pues se trata de una zona no muy extensa, que posee características comunes.

Tabla 12. Parámetros *in-situ* Segunda Campaña: 29 de julio, 2010

Punto de muestreo	CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	°C	Hora
P0	81,2	6,5	7,6	11:15
PE	210	6,5	9	12:40
PR	357	7,98	8,2	14:05

Al igual que en la campaña anterior, se repite la tendencia en conductividad eléctrica y pH debido a los mismos factores antes mencionados. No se observan variaciones sustanciales entre ambos periodos debido a que los dos muestreos se realizaron en fechas relativamente cercanas, en periodo invernal.

Tabla 13. Parámetros *in-situ* Tercera Campaña: 2 de noviembre, 2010

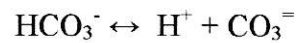
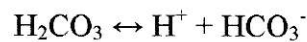
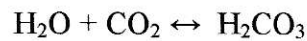
Punto de muestreo	CE ($\mu\text{S/cm}$)	pH	°C	Hora
P0	107	7,03	14	12:00
PE	293	8,26	22,1	12:40
PR	330	9,04	24	13:40

En este periodo, respecto del anterior se observan cambios; en la conductividad eléctrica de P0 se observa un aumento y esto se debe principalmente a que este muestreo se realizó en un periodo de mayor temperatura ambiental, lo que reduce el volumen de agua transportado y con esto aumenta la concentración de sólidos disueltos. Se observa por otra parte un aumento en los valores de pH medidos, esto puede deberse a efectos de concentración; al reducirse los niveles de caudal, la concentración de aniones alcalinos como bicarbonato y carbonato es mayor, lo que aumenta el pH.

Tabla 14. Parámetros *in-situ* Cuarta Campaña: 18 de noviembre, 2010

Punto de muestreo	CE ($\mu\text{S/cm}$)	pH	°C	Hora
P0	122	6,71	17,6	13:55
PE	284	7,9	29,8	14:17
PR	257	8,49	28,1	14:40

En esta campaña se aprecia una tendencia relativamente similar en lo que a conductividad eléctrica se refiere, mientras que se ve un comportamiento inverso entre pH y temperatura entre la tercera y cuarta campaña; en la última hay un aumento de temperatura y una disminución del pH, esto se puede deber a que el equilibrio químico del CO₂ en el agua se ve desplazado hacia la forma gaseosa, lo que reduce su concentración en el agua y con esto la concentración de aniones como HCO₃⁻ disminuyen su presencia llevando el pH hacia valores menores; esto también es apoyado por actividades biológicas que proliferan al aumentar la temperatura y por ende la demanda biológica de CO₂ se incrementa aportando al desplazamiento del equilibrio antes mencionado y presentado a continuación:



3.8. Resultados de Cromatografía de Gases

Para el análisis de las muestras recolectadas en la Viña Ventisquero se realizaron dos extracciones por muestra y se leyó en duplicado. A continuación se muestran los resultados del análisis realizado el 28 de diciembre de 2010 mediante GC para las 4 campañas de muestreo:

Tabla 15. Primera Campaña (en μgL^{-1}): 30 de junio, 2010

Plaguicida	P0	PE	PR
Sulfotep	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND
Clorpirifos	0,8	2,7	2,0
Triadimefon	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND
Captan	ND	ND	ND
Kresoxym m.	ND	ND	ND
Fenpropatrin	ND	ND	ND
Azinfos etil	ND	ND	ND
Acrinatrin	ND	ND	ND
Esfenvalerato	ND	ND	ND

Se puede observar que de los 12 plaguicidas estudiados en las muestras reales sólo se encontró Clorpirifos, el que tiene como límite de detección (LD) y cuantificación (LC) 1,1 y 2,2 μgL^{-1} respectivamente, por lo que solamente el PE está dentro del rango de cuantificación, mientras que el PR esta dentro del rango de detección. La concentración en P0 es tan baja que cae fuera del rango de detección.

Tabla 16. Segunda Campaña (en μgL^{-1}) de muestreo: 29 de julio, 2010

Plaguicida	P0	PE	PR
Sulfotep	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND
Clorpirifos	2,0	3,7	0,5
Triadimefon	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND
Captan	ND	ND	ND
Kresoxym m.	ND	ND	ND
Fenpropatrin	ND	ND	ND
Azinfos etil	ND	ND	ND
Acrinatrín	ND	ND	ND
Esfenvalerato	ND	ND	ND

En esta campaña de muestreo se observa que al igual que en la anterior sólo se encontraron cantidades de Clorpirifos. Las concentraciones en P0 y PE aumentaron respecto de la primera campaña, mientras que la concentración en PR disminuyó, probablemente debido a factores de dilución, provocada por las precipitaciones propias de la época de muestreo. P0 se encuentra dentro del rango de detección ($LD = 1,1 \mu\text{gL}^{-1}$) mientras que el PE se encuentra dentro del rango de cuantificación ($LC = 2,2 \mu\text{gL}^{-1}$). Por el contrario, la concentración del PR es tan baja que escapa del rango de detección calculado.

Tabla 17. Tercera Campaña (en μgL^{-1}) de muestreo: 2 de noviembre, 2010

Plaguicida	P0	PE	PR
Sulfotep	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND
Clorpirifos	2,7	2,0	4,2
Triadimefon	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND
Captan	ND	ND	ND
Kresoxym m.	ND	ND	ND
Fenpropatrin	ND	ND	ND
Azinfos etil	ND	ND	ND
Acrinatrín	ND	ND	ND
Esfenvalerato	ND	ND	ND

En esta campaña al igual que en las anteriores, sólo se encontró Clorpirifos en las muestras de agua, en concentraciones dentro del rango de cuantificación ($LC = 2,2 \mu\text{gL}^{-1}$) para P0 y PR, mientras que PE mostró una reducción en las concentraciones respecto de la campaña anterior, ubicándose dentro del rango de detección calculado ($LD = 1,1 \mu\text{gL}^{-1}$). El aumento en las concentraciones respecto de la campaña anterior se puede deber a las temperaturas de la época, las que al ser mayores, reducen el nivel de las aguas provocando un aumento en la concentración de sustancias en solución.

Tabla 18. Cuarta Campaña (en μgL^{-1}) de muestreo: 18 de noviembre, 2010

Plaguicida	P0	PE	PR
Sulfotep	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND
Clorpirifos	ND	2,4	4,3
Triadimefon	ND	ND	ND
Ciprodinil	ND	ND	ND
Captan	ND	ND	ND
Kresoxym m.	ND	ND	ND
Fenpropatrin	ND	ND	ND
Azinfos etil	ND	ND	ND
Acrinatrín	ND	ND	ND
Esfenvalerato	ND	ND	ND

En esta campaña se repite la situación de las campañas previas, donde se observa sólo la presencia de Clorpirifos. Al igual que en la campaña anterior se mantuvieron relativamente constantes las concentraciones de los puntos PE y PR, los que se encuentran dentro del rango de cuantificación ($LC = 2,2 \mu\text{gL}^{-1}$), esto debido también a que las temperaturas ambientales son elevadas en la época de muestreo. En el P0 se muestra un comportamiento que difiere completamente de lo exhibido en la campaña anterior, la que arrojó una concentración de $2,7 \mu\text{gL}^{-1}$.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Desde un punto de vista instrumental, la técnica Microextractor resulta simple de utilizar y versátil además de eficiente y segura, pues da la posibilidad de realizar más de una extracción en paralelo, lo que disminuye los tiempos de análisis (dependiendo, lógicamente, de la experticia del analista); por otro lado facilita la labor del analista al reducir la manipulación del sistema de extracción, que en el caso del clásico embudo de decantación requiere un elevado nivel de contacto exponiendo de algún modo al analista a riesgos asociados a derrames o salpicaduras.

La realización de varias curvas de calibración previas a la definitiva con extracción de plaguicidas tiene una utilidad fundamental, pues este proceso sirve para determinar los límites en detección que posee el equipo utilizado, además de servir como lineamiento para establecer los rangos de concentraciones óptimos para cada plaguicida estudiado.

Del proceso mencionado anteriormente se llegó a la fase de prueba del sistema de extracción Microextractor en muestras múltiples de plaguicidas, en la que se observó que no todos los plaguicidas fueron extraídos por n-hexano; por otra parte hubo algunos que presentaron porcentajes de eficiencia en la extracción muy bajos, lo que significa que no son lo suficientemente afines al solvente de extracción por lo que quedan mayoritariamente en la matriz. Otros, por las concentraciones tan bajas a

las que se llegó en las curvas de calibración previas, mostraron picos cromatográficos con poca definición, baja intensidad y forma asimétrica. Por todas estas razones se redujo la lista inicial de plaguicidas desde 22 a 12, quedando en evidencia que la técnica Microextractor no es eficiente en la extracción de todos los plaguicidas propuestos para este estudio; esto no indica en todo caso que sea una mala técnica, pues sí puede presentar mayor afinidad con otros compuestos no incluidos en este trabajo.

De los 12 plaguicidas considerados en el análisis de las muestras recolectadas en la Viña Ventisquero, sólo se observó presencia de Clorpirifos en todos los sitios de muestreo en las cuatro campañas realizadas (con excepción del P0 en la cuarta campaña); las concentraciones siguen el mismo patrón de conducta que la conductividad eléctrica entre campañas de época fría (alto caudal hídrico) y campañas de época cálida (bajo caudal), lo que sugiere que la concentración de Clorpirifos fluctúa por las variaciones del caudal desde donde se tomaron las muestras y no necesariamente por aumento en la cantidad del compuesto vertida - directa o indirectamente- a las aguas estudiadas.

Es importante destacar que la presencia de Clorpirifos en las aguas de la Viña Ventisquero no proviene de la propia Viña. Ésta entregó abiertamente el calendario de aplicación de plaguicidas, las fechas y cantidades utilizadas en cada aplicación, y en ninguna del periodo octubre-noviembre del año 2010 se aplicó Clorpirifos, lo que

claramente sugiere que su presencia en estas aguas obedece a probables aplicaciones en predios aledaños a la Viña y que por procesos de transporte Clorpirifos haya sido depositado en las aguas recolectadas; esto concuerda con el hecho de que Viña Ventisquero posee una toma de agua para riego desde el Río Tinguiririca, el que recorre un extenso tramo entre predios agrícolas, los que pueden haber aportado en la concentración de Clorpirifos observada.

Si bien la normativa chilena no incluye datos para Clorpirifos, es interesante hacer una comparación entre lo descrito para Carbaril –aunque no se trate del mismo plaguicida- en la Norma Chilena para Agua de Riego (Nch N° 1.333) que establece una concentración máxima de $70 \mu\text{gL}^{-1}$; en este trabajo el valor más alto encontrado es de $4,3 \mu\text{gL}^{-1}$ lo que significa que las aguas de riego que utiliza la Viña Ventisquero se encuentran dentro de la “norma” -en términos comparativos- cumpliendo así con los estándares nacionales requeridos.

V. CONCLUSIONES

- El programa de análisis ingresado en el cromatógrafo de gases utilizado en este trabajo fue eficiente para entregar cromatogramas con la separación adecuada entre picos cromatográficos y buena resolución de los mismos
- El espectrómetro de masas mostró un buen nivel de identificación de compuestos, ya que la mayoría de ellos exhibió coincidencias porcentuales mayores al 90%
- El detector de captura de electrones (μ ECD) mostró una alta sensibilidad, llegando a detectar cantidades del orden de los ppb (μgL^{-1})
- De los 22 plaguicidas incorporados inicialmente en el estudio, sólo 12 fueron extraídos con una eficiencia aceptable desde la matriz agua, comprobándose que n-hexano no es un solvente efectivo para toda la lista propuesta de compuestos
- El sistema de extracción Microextractor, utilizado en este trabajo es simple de usar y de sencillo funcionamiento y fabricación
- Se observó que en los estándares múltiples de compuestos como Triadimefon, Ciprodinil, Captan y Azinfos etil, las eficiencias de extracción van disminuyendo a medida que las concentraciones aumentan
- En las 4 campañas de muestreo se detecta presencia de Clorpirifos en todos los sitios de muestreo, con excepción del P0 en la Cuarta Campaña

- Los parámetros *in-situ* presentan una clara influencia estacional, mostrando aumentos en la conductividad eléctrica y temperatura de las muestras a lo largo de las sucesivas campañas
- P0 mostró generalmente las menores concentraciones de Clorpirifos, por tratarse de un punto de aguas claras, ubicado en el sector más alto de la Viña; esto lo valida como “punto limpio”
- En las primeras dos campañas, PE presentó las más altas concentraciones de Clorpirifos. En las dos últimas campañas, PR presentó las más altas concentraciones de Clorpirifos
- La presencia de Clorpirifos en las aguas de riego de la Viña Ventisquero no parece estar asociada a labores de aplicación de la misma, pues esta informó no haber utilizado este plaguicida en los periodos de muestreo
- Clorpirifos puede ser transportado en fuentes fluviales como el Río Tinguiririca, hasta llegar a las aguas de la Viña Ventisquero
- Comparando con lo informado en la Nch 1.333 de Calidad para Aguas de Riego, las concentraciones encontradas de Clorpirifos se encuentran por debajo del límite máximo impuesto por esta norma

VI. REFERENCIAS

- Advisory Committee on Pesticides, Annual Report 1997, HMSO London, 1999
- Agrow's Complete Guide to Agrochemical Marketing Strategies in the EU, Agrow Report DS 19, August 2000, PJB Publications, UK
- Barceló, D. 1993. Environmental protection agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *Journal of Chromatography*. 643, 117-143
- Barriuso E. 2000. Contaminaciones con plaguicidas utilizados en agricultura: el comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata
- Carreño, J. M., Planes, S. 2008. Plagas del campo. 13ª edición 2008, Editorial Aedos, pag 627- 628
- CDS Tomlin (ed), The Pesticide Manual, British Crop Protection Council (BCPC) UK, 2000
- “Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes en la población española: el rompecabezas sin piezas y la protección de la salud pública”, 2002. *Gaceta Sanitaria* 2002, 16 (3): 257-66. Publicación de Ediciones Doyma, S. L. 2004
- Coyuntura Silvoagropecuaria, Mayo de 2009 / OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS / artículos disponibles en www.odepa.gob.cl

- EU Directorate General for Agriculture, DG VI-B-II-I, Review report for the active substance azoxystrobin, (Document 7581/VI/97- Rev.5) Brussels 22 April 1998
- Estrada, M. 1998. Uso Moderado de Plaguicidas en México. Memorias, Ciclo de Conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México Gallego A, 1995. Análisis de datos estadísticos, Universidad de Córdoba. Servicio de Publicaciones, 112-113
- Guilherme, P. 2009. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. Journal of the Brazilian Chemical Society
- Harris H, 1994, Extracciones y separaciones líquido- líquido, editorial Reverte S.A., 472 -475
- H.Bubbert, H. Jennet. Surface & thin films Analysis. Wiley-vch 2002
- Henley y Seader, 1988. Separation Process Principles
- Hidalgo, C.1999. Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatograficas acopladas LC-LC y SPE-LC. Tesis Doctoral Universitat Jaume I, Departament de Ciències Experimentals Química Analítica. 213 -224
- JM Clough, CRA Godfrey, et al, Azoxystrobin: A Novel Broad-spectrum Systemic Fungicide, Pesticide Outlook, 1996, 7:16-20

- Jon W. Wong, Michael G. Webster, Catherine A. Halverson, Mathew J. Hengel, Kenley K. and Susan E. Ebeler, 2003. Multiresidue Pesticide Analysis in Wines by Solid-Phase Extraction and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometric Detection with Selective Ion Monitoring
- Lesueur, C. 2005. Routine Identification and Quantification of Pesticide Multiresidues in Fruit and Vegetable Samples with Full Scan, SIM and Deconvolution Reporting Software. WISSENSCHAFT UND PRAXIS
- Loewy, R.M. 2000. Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquen. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Argentina
- McNair y Miller, 1998. Basic Gas Chromatography, Wiley, New York
- Martínez V., J., González R., M., Belmonte V., A., Garrido F., A. 2004, Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. Ecosistemas, septiembre-diciembre. Vol. XII: 3. Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España. 30-38
- Manual Fitosanitario 2002-2003, Asociación Nacional de Fabricantes e Importadores de Productos Fitosanitarios, Santiago, CHILE. Pág. 394, 539, 547
- Norma Chilena para Agua de Riego, NCh N°1.333
- Oliva O. J. 2001. Incidencia de residuos de Azoxistrobin, Kresoxim metil y Quinoxifen sobre la población de distintas especies de Saccharomyces, Viticultura enología profesional, N° 77: 101-106

- Oriol, J.O., Del Castillo, B. 1998. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. Barcelona
- Proakis, J.G. y Manolakis, D.G. 1998. Tratamiento digital de señales. Principios, algoritmos y aplicaciones. Hertfordshire: PRENTICE HALL International (UK). 21-23
- Sánchez M.J, 1984. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo.
- Skoog, D.A. y Leary, J.J. 1994. Análisis Instrumental. Madrid: McGraw-Hill. p. 84-481
- Sustancias activas de productos fitosanitarios aceptadas, excluidas y en revisión comunitaria, a 20/04/2006. Lista publicada por la Dirección General de Agricultura del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España
- Waldemar, F. 1982. Fundamentos toxicológicos de los plaguicidas, Departamento de Medicina Preventiva y Social; Universidad Estatal de Campinas; Campinas, SP; Brasil
- World Health Organisation Recommended Classification of Pesticides by Hazard 1998-99 (ref. WHO/PCS/98.2), WHO, Geneva 1999

VII. ANEXOS

ANEXO A

A continuación se muestran las tablas de tratamiento estadístico de los 12 plaguicidas incluidos en el análisis de muestras reales:

Tabla 19. Tratamiento estadístico de Diazinon

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,001	24247	4908	20	16431	28614
0,002	22428	2315	10	20176	31815
0,005	56534	3574	6	53212	62739
0,01	140576	5129	4	136385	157121
0,05	411374	13408	3	393051	428976
0,1	868605	33148	4	815256	989249

Tabla 20. Tratamiento estadístico de Clorotalonil

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,002	30818	4384	14	22273	38689
0,005	73983	3775	5	57028	97793
0,01	327323	19034	6	301482	361934
0,02	703126	53966	8	551177	773373
0,05	992767	111798	11	862226	1158896
0,1	3007009	383460	13	2479956	3528115

Tabla 21. Tratamiento estadístico de Clorpirifos

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,002	207981	11106	5	186485	223317
0,005	504675	45445	9	444931	557766
0,01	762692	33519	4	739027	848440
0,02	1747275	15931	1	1703483	1948164
0,05	2739756	50011	2	2611462	2800203
0,1	5668384	231559	4	5381004	5920069

Tabla 22. Tratamiento estadístico de Triadimefon

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,002	25595	4223	16	19633	33632
0,005	27116	5298	20	20472	33779
0,01	72082	8543	12	60240	122808
0,02	180978	17506	10	108665	198212
0,05	835249	14910	2	796173	1012976
0,1	1861338	36773	2	1590666	1921801

Tabla 23. Tratamiento estadístico de Ciprodinil

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,0025	311	59	19	211	365
0,005	351	113	32	201	512
0,01	971	11	1	912	1238
0,05	2350	318	14	1823	2781
0,07	4990	186	4	4754	5270
0,1	6031	345	6	5634	7740

Tabla 24. Tratamiento estadístico de Kresoxym metil

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,001	50604	2596	5	48364	54451
0,002	90900	9405	10	79721	100840
0,005	219270	5043	2	209434	228431
0,01	430279	14450	3	414660	496957
0,05	1338399	45528	3	1256735	1400215
0,1	2846438	91666	3	2723513	2973750

Tabla 25. Tratamiento estadístico de Fenpropatrin

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,001	54118	1384	3	47983	58839
0,002	103566	5499	5	92364	112616
0,005	239481	5427	2	230647	249008
0,01	526313	25861	5	500649	576534
0,05	1585979	81843	5	1504137	1667822
0,1	3384122	118342	3	3226215	3727560

Tabla 26. Tratamiento estadístico de Azinfos etil

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,02	31533	3818	12	27081	36576
0,04	42315	9651	23	29406	55042
0,06	90647	7283	8	76952	111109
0,08	177309	12042	7	160053	191178
0,1	234224	45944	20	173618	272433

Tabla 27. Tratamiento estadístico de Acrinatrín

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,005	315761	5309	2	245106	331544
0,01	555504	22146	4	524081	624674
0,02	1131538	95362	8	1037077	1316184
0,05	1947546	19008	1	1702825	2001054
0,1	4311471	350751	8	3860339	4739431

Tabla 28. Tratamiento estadístico de Esfenvalerato

Concentración (mgL⁻¹)	Promedio	SD	CV (%)	L_{inf}	L_{sup}
0,002	106302	1924	2	101302	117954
0,005	302116	27648	9	265153	334878
0,01	532546	61547	12	465041	612487
0,02	1159106	103735	9	1052380	1372143
0,05	1962016	87023	4	1799364	2114112
0,1	4346675	296941	7	3924951	4861126

ANEXO B

Cálculo de eficiencia porcentual en la extracción

A continuación se muestra la manera de calcular la eficiencia, procedimiento que se realiza de igual manera para todos los plaguicidas. Se ejemplifica con Sulfotep, estándar 5 de la curva definitiva:

- De un cromatograma de extracción de plaguicida, se toma el área del estándar deseado y se divide por el área del mismo estándar pero el obtenido sin el proceso de extracción:

$$Eficiencia (\%) = \frac{\text{área con extracción}}{\text{área sin extracción}} * 100$$

$$Eficiencia (\%) = \frac{2654}{3198} * 100 = 83\%$$

Cálculo de LD y LC

A continuación se muestra la manera de calcular los límites de detección y cuantificación, procedimiento que se realiza de igual manera para todos los plaguicidas. Se ejemplifica con Sulfotep:

- Se realizan gráficos de la zona baja de Sulfotep, tanto de Concentración v/s Área y de Concentración v/s SD, de los cuales se extraen los valores necesarios para los cálculos: la respuesta del blanco: Ybl, que corresponde al intercepto de la curva de la zona baja. Posteriormente se obtuvo una segunda curva, graficando concentración de analito versus desviación estándar de las respuestas; de la ecuación de esta recta se obtuvo una estimación de la

desviación estándar del blanco: S_{bl} , cuyo valor corresponde al intercepto de esta segunda curva y donde “b” es la pendiente de la curva de calibración inicial (Figuras 59 y 60):

$$\text{Límite de detección} = \frac{y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$$

$$\text{Límite de detección} = \frac{74,064 + 3 * 13,707}{45656} = 0,0025 \text{ mgL}^{-1}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{74,064 + 10 * 13,707}{45656} = 0,0046 \text{ mgL}^{-1}$$