

UCH-FC
Q. Ambiental
C 172
C. 1



**“DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA DEL PESTICIDA CLORPIRIFOS
(¹⁴C) EN UN SUELO AGRÍCOLA DE LA VI REGIÓN MEDIANTE EL USO DE
TÉCNICAS ISOTÓPICAS”**

Seminario de Título entregado a la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile
para optar al título de

QUÍMICO AMBIENTAL

GABRIELA PAZ CAMARDA ROJAS



Directora Seminario de Título: Ing. Agr. M. Cs. Inés Pino N.

Profesora Patrocinante: M. Cs. Sylvia V. Copaja C.

Diciembre, 2005

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

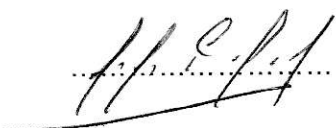

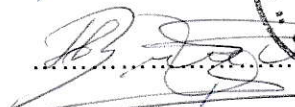
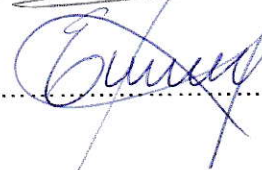
**INFORME DE APROBACIÓN
SEMINARIO DE TÍTULO**


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

Gabriela Paz Camarda Rojas

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de Título como requisito para optar al Título de Químico Ambiental.

COMISIÓN

Directora	Ing. Agr. M. Cs. Inés Pino N.	
Profesora patrocinante	M. Cs. Sylvia V. Copaja C.	
Corrector	M. Cs. Héctor Bravo V.	
Corrector	Dr. Edwar Fuentes P.	



A mi Familia



Agradecemos al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el apoyo brindado a este Seminario de Titulo a través del proyecto CHI/5/022



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que me acompañaron en esta importante etapa.

Al equipo de la Sección Agricultura de la Comisión Chilena de Energía Nuclear. A la Sra. Inés Pino, Sra. Adriana Nario, Sra. Ximena Videla, Sra. Ana María Parada y a Don Marcos Acuña, a todos, agradezco por guiarme y permitir el desarrollo de este seminario de título, por su acogida, siempre buena disposición, y el grato ambiente de trabajo.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, profesora Sylvia V. Copaja y Héctor Bravo por el apoyo, cariño y la confianza entregados durante estos años, igualmente también agradezco al profesor Dr. Edwar Fuentes por su buena disposición y aporte a este trabajo.

Finalmente agradezco especialmente a mi familia, por el incondicional apoyo y compañía.



ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.1.1 Problemática Ambiental	1
1.1.2 Uso de plaguicidas en Chile	3
1.1.3 Normativa vigente	5
1.2 Plaguicida en estudio: Clorpirifos	8
1.3 Dinámica de los plaguicidas en el suelo	13
1.3.1 Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo	16
1.3.2 Propiedades del suelo que determinan la dinámica del plaguicida	20
1.3.3 Propiedades del plaguicida que determinan su dinámica en el suelo	23
1.4 Persistencia de los plaguicidas	26
1.4.1 Concepto de vida media o TD_{50}	27
1.5 Metodologías de estudio de plaguicidas	29
1.5.1 Metodologías convencionales	30
1.5.2 Metodologías isotópicas	31



CAPÍTULO II	OBJETIVOS	39
	Objetivo general	39
	Objetivos específicos	39
CAPÍTULO III	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1	Recolección de muestras de suelo	40
3.2	Plaguicida utilizado en este estudio	43
3.3	Determinación de parámetros del suelo a estudiar	43
	3.3.1 Determinación de humedad inicial	43
	3.3.2 Determinación de Materia Orgánica	43
	3.3.3 Determinación de pH en agua y CaCl ₂	45
3.4	Determinación de la eficiencia de conteo del equipo contador de centelleo líquido	46
3.5	Determinación de la vida media del insecticida Clorpirifos	47
	3.5.1 Preparación de disoluciones	47
	3.5.2 Fortificación del suelo con insecticida Clorpirifos	48
	3.5.3 Incubación de las muestras de suelo	50
	3.5.4 Determinación de Clorpirifos residual en el suelo	51
3.6	Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos (RAM)	55
	3.6.1 Incubación de las muestras de suelo	55
	3.6.2 Recuento microbiológico de suelos	56

CAPÍTULO IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1	Determinación de parámetros físico-químicos del suelo Serie O`Higgins	57
4.2	Determinación de la vida media del insecticida Clorpirifos	60
4.2.1	Determinación de la eficiencia de conteo	60
4.2.2	Disipación del insecticida Clorpirifos	62
4.2.3	Cinética de degradación	79
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES	82
CAPÍTULO VI	BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS		92
Anexo I	Clasificación toxicológica de los productos fitosanitarios de uso agrícola	93
Anexo II	Reglas básicas de protección radiología para trabajo en laboratorio	94
Anexo III	Metodología de determinación de la capacidad de campo en suelos	96
Anexo IV	Tablas de datos experimentales	97
Anexo V	Cálculos desarrollados	105

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Distribución porcentual de Plaguicidas usados en Chile	4
Figura 2	Estructura química de Clorpirifos	8
Figura 3	Clorpirifos y sus metabolitos	10
Figura 4	Acción inhibidora de la Acetilcolinesterasa	12
Figura 5	Origen de los plaguicidas en el suelo	13
Figura 6	Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo	14
Figura 7	Secuencia de decaimiento radiactivo	37
Figura 8	Localidad El Olivar, VI Región	40
Figura 9	Plantación de vides variedad Ribier (Hileras 39-40)	41
Figura 10	Estructura química de ^{14}C - Clorpirifos [Etil-1- ^{14}C]	42
Figura 11	Fortificación del suelo Serie O`Higgins	48
Figura 12	Homogeneizador tipo pantalón	49
Figura 13	Incubación de las muestras de suelo (Sanyo Incubator MIR-253)	51
Figura 14	Secado de muestras de suelo (Estufa Kottermann 2771)	52
Figura 15	Oxidizador Biológico (Biological Oxidizer OX 500)	53
Figura 16	Contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000 TD)	54
Figura 17	Curva de Quenching Químico	61

Figura 18	Disipación de Clorpirifos en el suelo con contenidos de humedad de 50 y 75 % de la Capacidad de Campo (CC)	62
Figura 19	Clorpirifos residual en el suelo con contenidos de humedad de 50 y 75 % de la CC	64
Figura 20	Cinética de degradación de los plaguicidas en el suelo	66
Figura 21	Hidrólisis neutra de Clorpirifos	71
Figura 22	Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos	76
Figura 23	Tasa de degradación de Clorpirifos	80

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Plaguicidas agrícolas más vendidos en Chile	5
Tabla 2	Propiedades fisicoquímicas de Clorpirifos	9
Tabla 3	Procesos operantes en la dinámica de los plaguicidas en el suelo	14
Tabla 4	Principales isótopos trazadores que se emplean en los estudios sobre la relación suelo-planta	34
Tabla 5	Parámetros físico-químicos del suelo Serie O`Higgins	57
Tabla 6	Parámetros físico-químicos complementarios del suelo Serie O`Higgins (CCHEN, 2004)	59
Tabla 7	Comparación de tiempos de vidas medias para diferentes condiciones de suelos	65
Tabla 8	Constantes de degradación y vida media de Clorpirifos	80

GLOSARIO

Actividad radiactiva específica: Cantidad de radiactividad por unidad de peso (o volumen), del elemento total presente, incluidos tanto los isótopos activos como los estables. Se expresa en Bq/g, $\mu\text{Ci/g}$ ó Dpm/mg, Dps/mg etc.

Actividad radiactiva total: Número de núcleos que se desintegran por unidad de tiempo. La unidad de radiactividad (Sistema Internacional, SI) es el becquerelio (Bq) y corresponde a una desintegración por segundo (Dps).

Capacidad de Campo: Contenido de agua en porcentaje que un suelo saturado retiene en condiciones naturales de precipitaciones abundantes o riego artificial después que el agua gravitacional ha drenado determinando un contenido de agua estable en el suelo. En condiciones de laboratorio se define como el agua que retiene el suelo luego de ser saturado con agua y drenado por 24 a 48 horas.

Dosímetro: Instrumento portátil que registra y mide el total acumulado de radiación ionizante a la que ha estado expuesta una persona u objeto.

Dosis letal media (LD50): Dosis necesaria para eliminar el 50% de una población a prueba, expresado en mg/kg de peso vivo del animal.

Ingrediente activo: Parte biológicamente activa del producto fitosanitario, presente en una formulación.

Líquido centellador: Sustancia química que transforma la energía radiactiva en luz, por medio de la emisión de fotones.

Mesófilos: Microorganismos fundamentalmente compuestos por bacterias y hongos que desarrollan actividad biológica en rangos de temperatura entre 20-45°C, bajo condiciones normales de oxígeno.

Radiación ionizante: Emanación de fotones cuya energía es suficiente para desplazar electrones de los átomos y moléculas, transformándolos en partículas con carga eléctrica o iones.

Radioisótopos: Elementos radiactivos naturales y artificiales. Los elementos artificiales son generados en reactores nucleares y en aceleradores de partículas, y se obtienen bombardeando núcleos de elementos estables con neutrones o con partículas cargadas.

Limite máximo de residuos (LMR): Cantidad máxima de residuos tóxicos de un plaguicida, que equivale a la cantidad de residuos en mg de producto químico por kg de producto fresco o procesado, de origen vegetal o animal que es toxicológicamente aceptable para no provocar problemas en la salud del consumidor.

Trazador: Isótopo estable ó radiactivo de un elemento introducido en sistemas ambientales con el fin de evaluar el comportamiento y seguir la trayectoria de los componentes en dicho sistema.

RESUMEN

El Clorpirifos es un insecticida organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura chilena en el control de pestes de insectos en el suelo y diversos cultivos. Desde un punto de vista medioambiental, conocer el comportamiento y destino del Clorpirifos bajo diferentes regímenes de humedad en el suelo es importante debido a que contribuye a optimizar su uso, asegurando que no se produzcan efectos colaterales dentro o fuera del área de aplicación y además especifica las condiciones de aplicación óptimas para obtener mejores resultados en el tratamiento con el insecticida en terreno.

En este trabajo se estudió la vida media del pesticida Clorpirifos (^{14}C) en un suelo agrícola de la VI región, mediante el uso de técnicas isotópicas, bajo dos regímenes de humedad de 50 y 75% de la Capacidad de Campo (CC). Las muestras de suelo fueron fortificadas con dosis de 10 mg de Clorpirifos por kg de suelo e incubadas a 20°C, en ausencia de luz. Mediante muestreos periódicos realizados durante 110 días de ensayo, se determinó el porcentaje de disipación del insecticida a través de la cuantificación de ^{14}C Clorpirifos remanente en el suelo detectado por medio de un contador de centelleo líquido. Los resultados experimentales obtenidos muestran diferencias temporales en la vida media para diferentes regímenes de humedad, con $T_{1/2}$ de 21 y 28 días para el suelo a 75 y 50% de la CC respectivamente.

Se analizaron, las principales características (tanto del suelo como del plaguicida) que podrían afectar esta velocidad de degradación, ya sea acelerando ó inhibiendo el proceso de disipación de Clorpirifos bajo los regímenes de humedad descritos.

Los resultados indicaron que la rápida degradación del insecticida organofosforado en el suelo a 75% de la CC es producto de procesos bióticos y abióticos. Entre los procesos abióticos la hidrólisis neutra constituyó la mayor ruta de disipación, por sobre otros procesos, principalmente debido al contenido de humedad y pH presentado por el suelo (pH 7,2). Sin embargo, factores como el alto contenido de materia orgánica del suelo, baja solubilidad en agua, alto coeficiente de adsorción y enlace P=S del Clorpirifos, sugieren que el proceso de sorción inhibiría la hidrólisis, retardando los tiempos de vida media determinados en este trabajo.

En cuanto a los procesos bióticos, la biodegradación también se vió influenciada por el mayor contenido de humedad del suelo, donde el suelo a 75% de la CC, mostró una mayor actividad microbiana y consecuentemente una disipación de Clorpirifos más rápida con un $T_{1/2}$ menor, en comparación al suelo con menor contenido de humedad. Sin embargo, la contribución de la biodegradación se ve disminuida en comparación al proceso de hidrólisis, debido a que las condiciones de incubación del suelo disminuyen la actividad microbiana en el tiempo.

En ambos tratamientos de humedad se presenta una disipación bifásica de Clorpirifos, mostrando una rápida disipación inicial seguida de una fase lenta de larga duración. La velocidad de disipación de Clorpirifos fue ajustada y descrita adecuadamente por un modelo cinético de primer orden ($r^2 = 0,96$), con $T_{1/2}$ que difieren en porcentajes inferiores al 10%.

Finalmente se destaca entre las ventajas presentadas por esta técnica, la baja variabilidad entre las mediciones experimentales, la alta sensibilidad de detección y además la posibilidad de detección y cuantificación sin la necesidad de extraer los analitos desde la matriz.

ABSTRACT

Chlorpyrifos is an organophosphorus insecticide widely used in Chilean agriculture in the control of plagues of insects in soil and several crops. From an environmental point of view, to know the behavior and fate of Chlorpyrifos under different moisture regimes in soil is important because it contributes to optimize its use, assuring that collateral effects do not take place inside or outside the application area and in addition it specifies the optimal conditions of application to obtain better results in the treatment with the land insecticide.

In this work it was studied the half life of Chlorpyrifos (^{14}C) in an agricultural soil of VI Region, by means of the use of Isotopic techniques, under two moisture regimes of 50 and 75% of the Field Capacity. The ground samples were fortified with doses of 10 mg/Kg and incubated to 20°C and in absence of light. The dissipation of Chlorpyrifos in soil was determined during 110 days of test, through the quantification of remaining $^{14}\text{CO}_2$ by liquid scintillation counting. Results show temporary differences in the half life for different moisture regimes, with $T_{1/2}$ of 21 and 28 days for the soil to 75 and 50% of the Field Capacity, respectively.

It was studied the factors related to soil and plaguicide that could affect speed of degradation, either accelerating or inhibiting the process of dissipation of Chlorpyrifos, under the described moisture regimes.

The results indicated that the fast degradation of the insecticide organophosphorus in the soil to 75% of the CC is product of biotic and abiotic processes. Between the abiotic processes the neutral hydrolysis constituted the principal route of dissipation, mainly due to the moisture content and pH presented in soil (pH 7,2). Nevertheless, factors as the high content of organic matter of the soil, low water solubility, high coefficient of adsorption and bond P=S of the Chlorpyrifos, they suggest the sorption process would inhibit hydrolysis, slowing down the determined times of half life in this work.

As far as the biotic processes, the biodegradation was also influenced by the greater moisture content of the soil, where the soil to 75% of the Field Capacity, has shown the greater microbial activity and faster dissipation of Chlorpyrifos with a smaller $T_{1/2}$, in comparison to the soil with minor moisture contained. Nevertheless, the contribution of the biodegradation is diminished in comparison to hydrolysis process, due to the conditions of incubation of the soil diminish the microbial activity in the time.

In both moisture treatments, the dissipation of Chlorpyrifos present a two-phase process, showing a fast initial stage followed by a long term slow phase. The speed of dissipation of Chlorpyrifos was fitted and described suitably by a kinetic model of first order ($r^2 = 0.96$), with $T_{1/2}$ that differs in inferior percentage to 10%.

Finally between the advantages presented by this technique, the low variability, the high sensitivity of detection and in addition the possibility to detection and quantification without the necessity of an extraction of analytes from soil samples.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 Problemática Ambiental

Dada la gran demanda de alimentos por parte de la población mundial actual y a la proyectada en los próximos 20 años, se hace necesario aumentar de manera eficiente la productividad agrícola por unidad de superficie bajo cultivo. Debido a que dicha productividad es limitada, se requiere utilizar en forma masiva productos fitosanitarios (insecticidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas y otros), en cultivos y frutales permitiendo reducir así, la incidencia de plagas agrícolas manteniendo altos niveles productividad.

Con el objeto de obtener productos horto-frutícolas libres de pestes y plagas, el agricultor muchas veces aplica dosis más altas y con mayor frecuencia de la recomendada por el fabricante, aumentando así la probabilidad que el producto de exportación sea rechazado por no cumplir los límites máximos residuales exigidos por los mercados internacionales.

Esta situación genera además un costo de tipo ambiental, ya que la aplicación desmedida de estos productos afectan indudablemente los recursos naturales (suelo, aire, y agua), provocando de esta manera contaminaciones innecesarias, lo cual afecta la salud de las personas.

Por esto, es urgente tener como objetivo un desarrollo sustentable de la agricultura, teniendo en cuenta que cada día son mayores las barreras sanitarias y de calidad impuestas por los mercados exportadores (SAG, 2001).

Es por eso, que uno de los grandes desafíos de nuestra economía exportadora agrícola, consiste en mejorar las condiciones ambientales del medio silvoagropecuario, mediante cambios en las prácticas agrícolas en el marco de la producción limpia, donde el conocimiento del suelo, y por otro lado, el conocimiento químico de las reacciones, tiempos de vida media y procesos de remoción de los plaguicidas en los distintos compartimentos ambientales, bajo las condiciones locales de uso, adquiere gran relevancia. Además, es necesario considerar el efecto de las condiciones meteorológicas, (vientos, temperatura, humedad) en los aspectos antes mencionados.

Con ello cada día los exportadores nacionales enfrentan nuevos desafíos debido al creciente interés de los países desarrollados por la calidad del medio ambiente y la seguridad de los productos consumidos, lo que ha provocado la instauración de nuevas y mayores exigencias para quienes deseen exportar a estos mercados, que no sólo deben demostrar la inocuidad de sus productos, sino que además deben realizar sus manejos productivos minimizando el impacto negativo sobre el medio ambiente. Es así como los principales mercados compradores de frutas y hortalizas de nuestro país (Europa, Estados Unidos y Medio Oriente) comienzan a exigir la puesta en práctica de una serie de medidas relacionadas con la calidad de la fruta y hortalizas, la protección del medio ambiente y la protección del trabajador, las cuales se enmarcan en el concepto de "Buenas Practicas Agrícolas, BPA" (CONAMA, 1998).

Como una respuesta adecuada a la situación anterior que combina el control de plagas, las buenas prácticas agrícolas y la conservación ambiental, se define el Manejo Integrado de Plagas (MIP), en donde el objetivo principal es la optimización de los recursos más que una maximización de ellos con la participación de todos los segmentos sociales, es decir, usuarios, industria, gobierno y organismos internacionales.

Es entonces prioritario, evitar o bien minimizar la contaminación innecesaria de los recursos naturales, y estudiar el comportamiento de los plaguicidas utilizados en el país, si se quiere lograr una agricultura sustentable, que permita asegurar la alimentación nacional y así mismo continuar proyectándose en mercados internacionales, sin contaminar ni agotar los recursos naturales, ni afectar la salud humana (CONAMA, 1998).

1.1.2 Uso de plaguicidas en Chile

En Chile, de los US\$ 8 millones gastados en el consumo de plaguicidas en la década de los 70, esta cifra ha aumentado hasta US\$ 250 millones registrados para la década de los 90, lo que coincide con el grado de tecnificación y desarrollo que ha tenido la agricultura chilena en los últimos años (Banco Central, 2000).

En nuestro país, al igual que en el resto del mundo, las importaciones de plaguicidas también han ido aumentando considerablemente, en su mayoría para cultivos destinados a la exportación, lo que ha llevado a un aumento en el uso de estos productos en la mayoría de las regiones. La utilización de plaguicidas en Chile, durante el año 2003, se presenta en el Figura 1, agrupados según el tipo de acción en distribución porcentual.

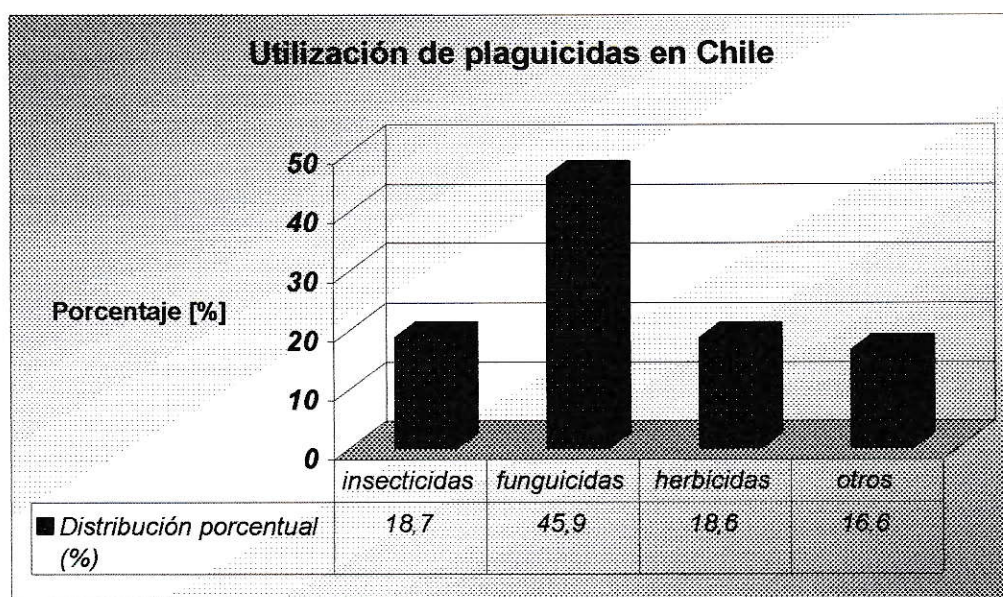


Figura 1: Distribución porcentual de Plaguicidas usados en Chile (SAG, 2003).

En cuanto a los plaguicidas más vendidos en el país, independiente de la clasificación según el tipo de acción, pero de acuerdo al ingrediente activo, el SAG realizó el año 2003, la Declaración de ventas de plaguicidas, donde se excluyen aquellos compuestos que carecen de registro legal. A continuación, la tabla 1 presenta el volumen de ventas en toneladas según la formulación del plaguicida.

Tabla 1: Plaguicidas agrícolas más vendidos en Chile (SAG, 2003).

Ingrediente activo	Volumen (Tn)	Porcentaje (%)
Ac. Crómico/ Ox. Cúprico/Pentóxido de Arsénico	532,1	1,39
Aceite Mineral	3198,8	8,34
Ácido Giberelico	653,6	1,7
Ácido Giberelico GA3	4102,8	10,69
Azufre	11982,3	31,22
Cianamida	459,7	1,2
Cianamida Hidrogenada Estabilizada	501,3	1,31
Clorpirifos	1148,6	2,99
Glifosato	4968,1	12,95
Oxicloruro de Cobre	1596,4	4,16
Ox. Cuproso	516,5	1,35

Mientras que a escala regional, las que registran mayor consumo corresponden a la VI Región, seguida de la VII y Región Metropolitana, con un 33%, 28,1% y 20,7% respectivamente (SAG, 2003).

1.1.3 Normativa vigente

A partir del año 2000, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), creó el sub-departamento de plaguicidas, con el objetivo de fortalecer la política nacional con relación al uso y manejo de plaguicidas, tema que ha sido considerado como uno de

los 7 temas relevantes de la acción estratégica del Ministerio de Agricultura de Chile, para el periodo 2000-2005.

En cuanto a la legislación chilena, todos los plaguicidas de uso agrícola, que se importen y se fabriquen en el país, deben ser autorizados por el SAG. Para ello mediante la resolución N° 3.671 de 1999, se estableció un sistema de muestreo y análisis de todos los plaguicidas de uso agrícola que se importen en el país y aquellos formulados en Chile, antes de su comercialización. Si bien no existe en Chile normativa específica respecto de plaguicidas que trate en forma conjunta el manejo y eliminación de estos productos, actualmente existen dos cuerpos legales del Ministerio de Agricultura y del SAG, que en forma complementaria conforman la normativa legal existente referida a plaguicidas de uso agrícola, quienes a través del *Decreto Ley N° 3.557* del Ministerio de Agricultura del 29 de Diciembre de 1980, referido a "La Protección Agrícola", en sus artículos 32° al 36° reglamentan la materia.

Como órgano fiscalizador, el Ministerio de Agricultura, a través del SAG, reglamenta y controla los aspectos como la fabricación, importación, envasado, etiquetado, distribución y aplicación de plaguicidas. El objetivo del SAG es velar por el empleo correcto y eficiente de los plaguicidas de uso agrícola en la protección de los cultivos, la fauna y el medio ambiente, con riesgo mínimo para la salud humana.

Factores tales como la limitada fiscalización de los organismos reguladores por falta de recursos, mayor número de productos disponibles en el mercado que los registrados en el SAG, aumento de importación de plaguicidas en los últimos 10 años, venta de plaguicidas sin las recomendaciones del fabricante, desconocimiento de los

ingredientes activos que se encuentran actualmente prohibidos, etc. hacen que no exista un control efectivo sobre el uso de estos productos (SAG, 2003).

Por otra parte aunque el uso de estos productos fitosanitarios, presenta ventajas económicas considerables, empleándose para mantener o mejorar el rendimiento de las cosechas, eliminando o reduciendo el ataque de las plagas, disminuyendo de esta manera la mano de obra necesaria y beneficiando al agricultor de una producción más eficaz y al consumidor de un producto de mejor calidad y menor precio, el uso de estos compuestos lleva consigo serios problemas ambientales. Al prepararse deliberadamente para ser tóxicos a niveles de trazas frente a determinados organismos, provocan alteraciones en los ecosistemas terrestres, calidad de las aguas, en los alimentos de procedencia agrícola, en la salud de los operarios dedicados a su manejo y aplicación, etc.

Es por lo anterior que la resolución de dicha problemática ambiental es de vital importancia, y por lo tanto es necesario predecir el comportamiento de los plaguicidas liberados en el ambiente para anticipar, y por ende minimizar, los impactos adversos fuera del punto de aplicación. Esto significa que se debe comprender desde un punto de vista químico qué le sucede a un plaguicida que ha sido aplicado en el campo, y predecir su destino en el ambiente. Una de las formas para lograr este objetivo, es a través de la información obtenida mediante investigación científica utilizando para ello técnicas innovadoras, altamente sensibles y precisas.

1.2 Plaguicida en estudio: Clorpirifos

El Clorpirifos (Figura 2), es un insecticida órganofosforado de amplio espectro de acción, utilizado sin restricciones, desde 1970, tanto en la agricultura, como a nivel domestico. En Chile, la venta de Clorpirifos alcanza las 712,7 Toneladas de acuerdo a la “Declaración de ventas de plaguicidas agrícolas”, en el periodo comprendido entre julio y diciembre de 1998 (SAG, 1998).

En la agricultura, es particularmente efectivo en el control de escamas, pulgones y larvas de lepidópteros, es decir en insectos masticadores, minadores y chupadores de diversos cultivos. Usado también en frutales de pepita y carozos. En la vivienda se usa para controlar cucarachas, pulgas, y termitas (AFIPA, 1999).

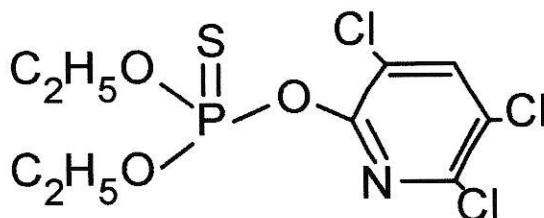


Figura 2: Estructura química de Clorpirifos, [0,0-dietil 0-(3, 5,6 tricloro-2-piridil) fosforotioato] (Racke, 1993).

Su formulación comercial es polvo mojable, es decir consiste de partículas sólidas finamente pulverizadas del ingrediente activo, un acarreador sólido o diluyente, un surfactante, un agente humectante y uno dispersante. Comúnmente entre el 50% - 80% (en peso) de la formulación corresponde al plaguicida (BASF, 2004).

A continuación, en la tabla 2, se muestran las principales propiedades del insecticida.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas del Clorpirifos (Racke, 1993).

Propiedades fisicoquímicas	
Formula molecular	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
Masa molar	$350,59 \text{ g mol}^{-1}$
Estado físico	Cristales sólidos
Densidad (a 20°C)	$1,084 \text{ g L}^{-1}$
Punto de fusión	41-44°C
Presión de vapor (a 25°C)	$2,0 \times 10^{-5} \text{ mm Hg}$
Solubilidad en agua (a 25°C)	$1,2 \text{ mg L}^{-1}$
Coefficiente de partición Octanol/agua (Kow)	50.000
Coefficiente de adsorción (Koc)	8498 mL g^{-1}

Debido al carácter apolar de la molécula, presenta una baja solubilidad en agua y una gran tendencia a adherirse a las partículas de suelo, característica común en los plaguicidas órganofosforados, los cuales son persistentes y tienden a acumularse en el suelo (Racke, 1993). Clorpirifos es degradado, a través de procesos tanto bióticos como abióticos. En ambos casos, la mayor ruta de transformación es la hidrólisis, donde se produce la ruptura del enlace tioester de la molécula, dando origen a 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), su principal metabolito (Figura 3).

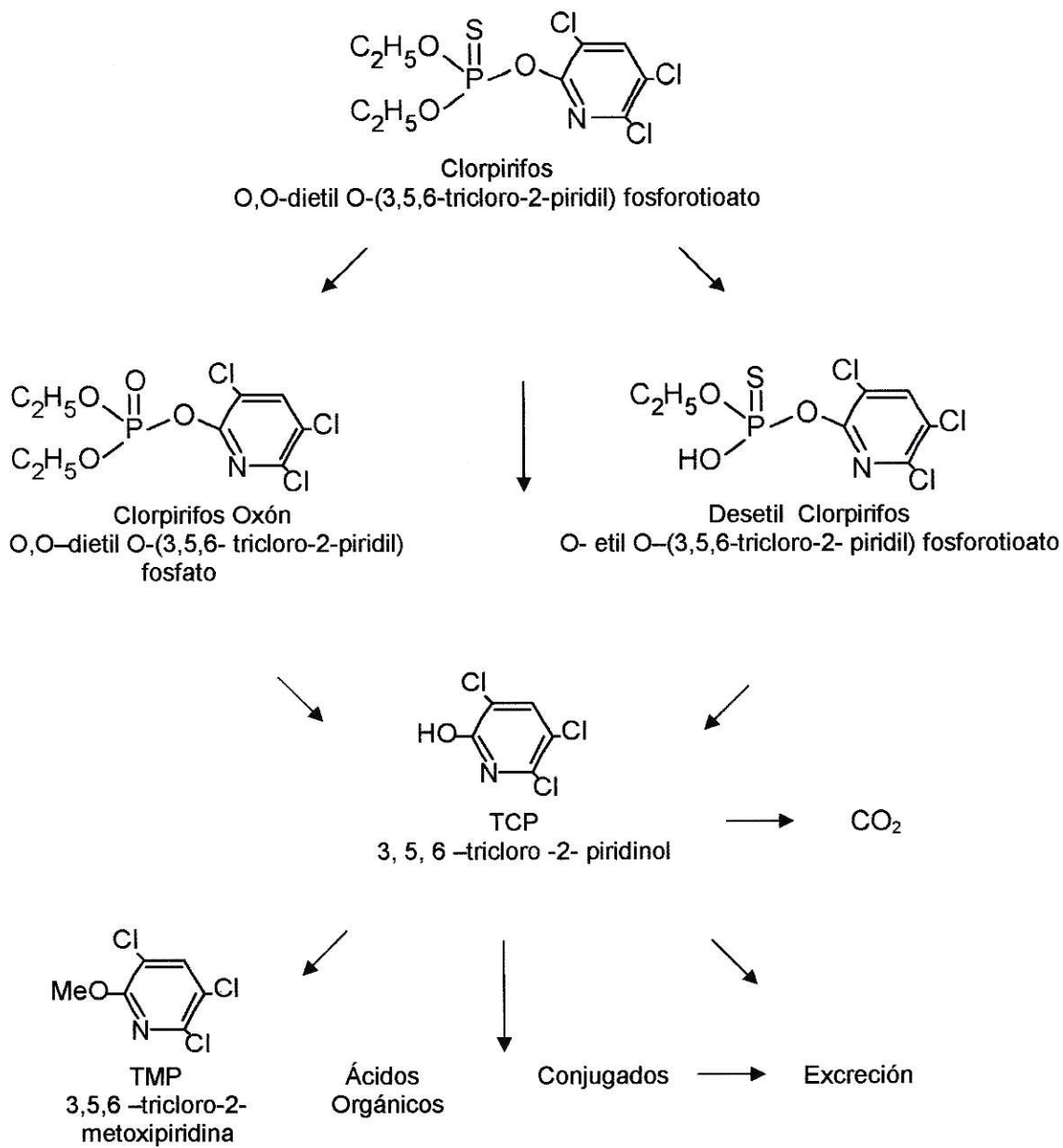
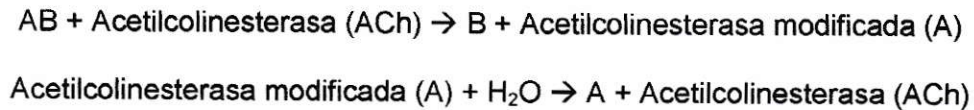


Figura 3: Clorpirifos y sus metabolitos (Racke, 1993).

Según el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2000), de acuerdo a la resolución N° 2196, el Clorpirifos es clasificado entre los productos de clase III, es decir, moderadamente tóxico (Anexo I), presentando toxicidad aguda (definida para ratas) de $LD_{50} < 4.000 \text{ mg kg}^{-1}$ (dermal) y de 300 a 590 mg kg^{-1} (oral) (AFIPA, 1999). Por otra parte, la Norma Chilena (NCh) N° 2190 lo clasifica como 6.1, es decir como sustancia nociva y venenosa. (Decreto 298 Transporte de Sustancias Peligrosas) (BASF Chile, 2004). Sin ser un plaguicida sistémico, sino de contacto, atraviesa la cutícula vegetal, así como los insectos protegidos por escamas. Su modo de acción es a través de contacto, inhalación e ingestión. Las dos primeras constituyen las rutas más comunes de penetración al organismo en intoxicaciones laborales. Con respecto a la toxicología, al igual que la mayoría de los organofosforados, actúa como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (ACh), responsable de la destrucción y término de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC), de esta manera, se produce la acumulación de AC afectando el funcionamiento normal del impulso nervioso y alterándose finalmente la sinapsis (CEPIS/OPS, 2005). La acción de la (ACh) es muy rápida, se estima que es capaz de hidrolizar una molécula de acetilcolina en ácido acético y colina en un milisegundo (Figura 4). La reacción química producida en este proceso es:



Así mismo, los plaguicidas organofosforados reaccionan inhibiendo la ACh a través de la siguiente reacción:



AB corresponde al plaguicida organofosforado, donde en un primer paso la parte ácida (A) del plaguicida se incorpora covalentemente en el sitio activo de la enzima (acción inhibitoria), mientras que libera su fracción alcohólica (B). Luego, una molécula de agua libera la parte ácida (A) del plaguicida, dejando la enzima libre y por lo tanto reactivada.

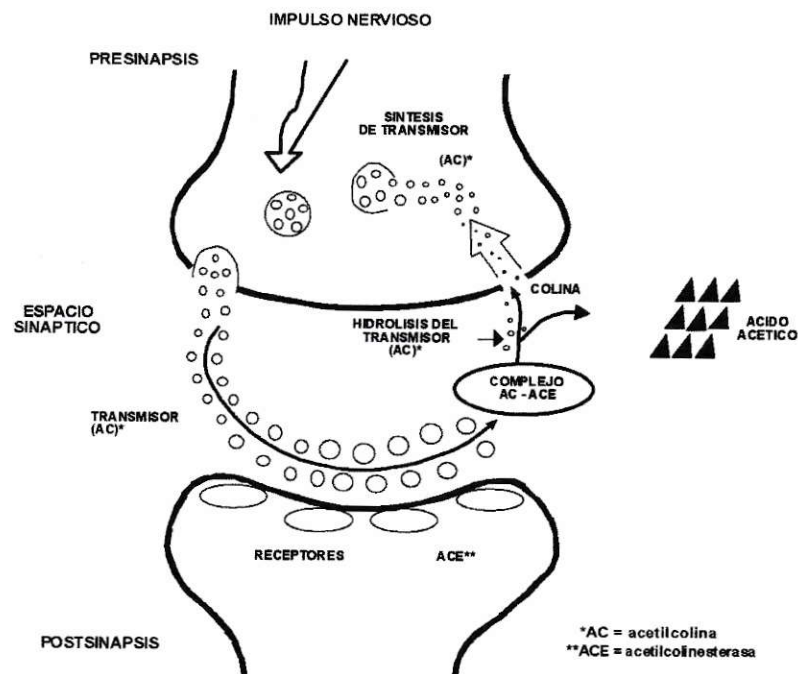


Figura 4: Acción inhibitoria de Acetilcolinesterasa.

La exposición a niveles bajos del insecticida puede producir una variedad de efectos sobre el sistema nervioso, los que incluyen visión borrosa, dolores de cabeza, lagrimeo, excesiva salivación, secreción nasal, mareos, debilidad muscular, náuseas, diarrea y un aumento brusco de la frecuencia cardíaca. En tanto que la exposición a

altos niveles puede producir sudor excesivo, convulsiones, pérdida del conocimiento (coma) ó incluso la muerte (ATSDR, 1997).

1.3. Dinámica de los plaguicidas en el suelo

El conocimiento de la dinámica de los plaguicidas en el suelo es importante tanto para optimizar el uso, así como para asegurar que no se produzcan efectos colaterales dentro o fuera del área de aplicación. La presencia de los plaguicidas en los suelos se produce por diversas vías (Figura 5).

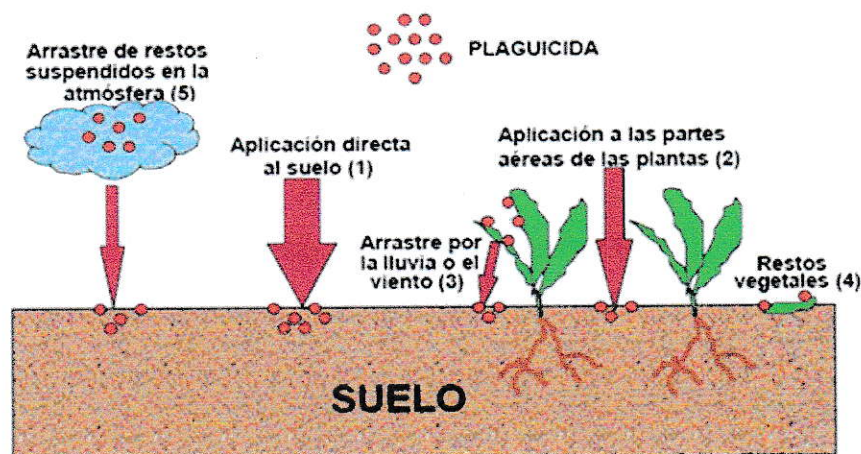


Figura 5: Origen de los plaguicidas en el suelo (Cornejo, 2001).

Las dos vías principales por las cuales los plaguicidas llegan al suelo son a través de la aplicación directa (1) (como es el caso de nematicidas, desinfectantes y determinados herbicidas) y, cuando la aplicación se efectúa en las partes aéreas de las plantas para combatir sus plagas (2). En este caso se estima que aproximadamente el 50% del producto aplicado se deposita en el suelo, ya que es prácticamente imposible aplicarlo con exclusividad a la planta.

Lo anterior ocurre normalmente en la aplicación de insecticidas, fungicidas y el caso de algunos herbicidas. Otra posibilidad es que los plaguicidas lleguen al suelo a través del arrastre por el agua o viento del plaguicida que se ha depositado en el vegetal (3), a través de restos vegetales desprendidos que quedan en el suelo al recolectar el cultivo (4), o bien por deposición de aquellos restos que se encuentren suspendidos en la atmósfera (5) (Navarro y col, 1992). Una vez en el suelo, el plaguicida ingresa en un ecosistema dinámico, donde inmediatamente comienza a experimentar una serie de procesos que determinan su comportamiento (Tabla 3), que pueden agruparse en procesos de transferencia y procesos de transformación o degradación (Navarro y col, 1992., Cornejo, 2001., Kogan y Pérez, 2003).

Tabla 3: Procesos operantes en la dinámica de los plaguicidas en el suelo (Navarro y col, 1992).

Procesos	Transferencia	Adsorción-Desorción
		Volatilización
		Difusión
		Erosión, escorrentía
		Lixiviación
		Absorción por la planta
		Asimilación por animales y microorganismos del suelo
	Transformación	Fotodescomposición
		Degradación química
		Degradación microbiológica o Biodegradación

Los procesos de transferencia implican un movimiento del plaguicida de una fase a otra (suelo-agua-atmósfera) o bien, dentro de una misma fase, mientras que en los procesos de transformación, el plaguicida se convierte en un compuesto químico diferente. Ambos procesos (Figura 6) están interrelacionados entre sí, y por ello un conocimiento global y simultáneo de todos ellos resulta fundamental a la hora de predecir el comportamiento del plaguicida en el suelo.

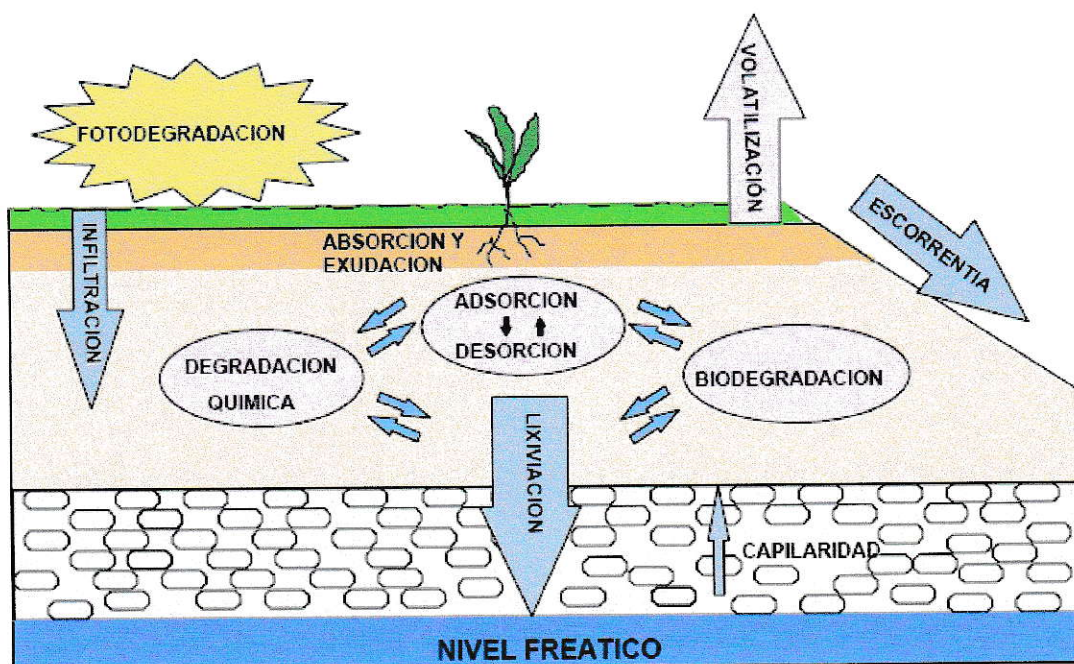


Figura 6: Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo

(Cornejo, 2001).

1.3.1 Procesos que determinan la dinámica de los plaguicidas en el suelo.

a) Adsorción-desorción

El proceso de adsorción se debe a la atracción entre una superficie sólida, el adsorbente y un vapor (o un soluto en una disolución), resultante de la interacción de fuerzas desde la superficie del adsorbente (suelo) hacia las moléculas o iones del adsorbato (plaguicida). Estos procesos pueden ser clasificados en función de la energía con la que se efectúen. Cuando la energía es menor a $10 \text{ Kcal. mol}^{-1}$, se habla de adsorción física reversible, y de adsorción química irreversible cuando la energía es mayor a dicho valor. En ella influyen factores tales como la naturaleza, composición coloidal mineral y orgánica del suelo (representados por la arcilla, las moléculas húmicas y los óxidos de hierro y aluminio respectivamente), características propias del pesticida (físicas y químicas), temperatura y humedad del suelo, grado de saturación de los coloides, etc.

El proceso puede ser evaluado a través del coeficiente de adsorción K_d , el cual se define como el cociente entre la cantidad de plaguicida adsorbido y cantidad de plaguicida en solución. Así, mientras menor es el valor del coeficiente K_d , menor es el proceso de adsorción del plaguicida, por lo tanto, éste es altamente móvil y fácilmente lixiviable (Navarro y col, 1992).

b) Volatilización

La volatilización de plaguicidas desde el suelo y subsiguiente dispersión en la atmósfera es una vía frecuente en su movimiento y desaparición. Esta dinámica está

íntegramente relacionada con la presión de vapor del plaguicida, pero además influyen en este proceso la temperatura ambiente, la composición coloidal del suelo, contenido de agua y pH del suelo, concentración y grado de adsorción del plaguicida. Mientras la temperatura y el contenido de agua favorecen el proceso, la adsorción reduce la volatilización del plaguicida (Navarrete, 1995).

c) Difusión

Es el movimiento del plaguicida a causa de un gradiente de concentración. Este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales desde las zonas más concentradas a las menos concentradas. El flujo del material se expresa por el coeficiente de difusión, y depende del tamaño, características químicas de la molécula que se difunde y además de las características del medio por el cual se difunde la molécula (temperatura y viscosidad). Los factores que principalmente influyen son, el coeficiente de difusión, solubilidad y presión de vapor, temperatura, contenido de agua y porosidad del suelo, y finalmente el grado de adsorción del plaguicida (Saltzman y Yaron, 1986).

d) Erosión

Ya que los plaguicidas están frecuentemente asociados a las partículas del suelo, éstas pueden actuar como portadoras del plaguicida cuando son trasladadas de un lugar a otro tanto a través de viento como a través del agua. En general los plaguicidas que se desplazan con mayor facilidad debido a la erosión son aquellos

que presentan una baja movilidad por si mismos y una alta adsorción en el suelo, como es el caso de los plaguicidas organoclorados (Navarro y col, 1992).

e) Lixiviación

Es un proceso frecuente debido al efecto de lluvias o riegos. En estos casos, se puede realizar movimiento del plaguicida de manera vertical, por estar asociado al agua en disolución, suspendido en ella o emulsionado. La magnitud del proceso depende principalmente de la composición coloidal del suelo (arcillas, materia orgánica, óxidos de hierro y aluminio), de la naturaleza y solubilidad del plaguicida, contenido de agua y pH del suelo, de los cationes adsorbidos a los coloides, de la concentración de sales, etc. La lixiviación de los plaguicidas altamente móviles en el suelo debe ser motivo de preocupación para así evitar la contaminación de las napas freáticas (Saltzman y Yaron, 1986).

f) Absorción por la planta

En muchos cultivos que se desarrollan en zonas donde se han aplicado con frecuencia tratamientos con plaguicidas, las plantas pueden absorberlo en proporciones variables dependiendo de la naturaleza del cultivo, propiedades físico-químicas del plaguicida, condiciones climáticas, características del suelo y el grado de contaminación que éste presente. En la absorción, el plaguicida puede penetrar en el sistema radicular de la planta por vías y mecanismos similares a la absorción de los iones inorgánicos, es decir, junto al agua absorbida y trasladarse a través del vegetal

por los sistemas vasculares xilema y floema, acumulando el plaguicida y transfiriéndolo a los frutos (Navarro y col, 1992).

g) Asimilación por animales y microorganismos

En suelos agrícolas, muchos animales y microorganismos que desarrollan en ellos su ciclo vital, son capaces de asimilar un gran número de plaguicidas, concentrándolos en sus cuerpos por encima de los niveles ambientales. Es el caso de invertebrados como lombrices de tierra, babosas, microorganismos micelios de hongos y determinadas células bacterianas que pueden adaptar e integrar el plaguicida a su proceso metabólico (Navarro y col, 1992).

h) Fotodescomposición

Esta modificación química de los plaguicidas viene producida por la interacción de la radiación solar ultravioleta y visible (240-700 nm) con ciertos enlaces de la molécula, y afecta especialmente a los grupos C=C, -OH, -SH, C=O, -Cl, -N=, así como a dobles enlaces conjugados. La fotodescomposición también puede tener lugar a través de sustancias fotorreceptoras (clorofilas, carotenos, y sobre todo compuestos húmicos) capaces de captar energía lumínica y de traspasarla a los plaguicidas. Este proceso depende de una serie de otros factores, como la presencia de catalizadores fotoquímicos, intensidad y tiempo de exposición (que favorecen la descomposición), el pH y grado de aireación del suelo, y también del grado de adsorción y características químicas del plaguicida. Este último factor se atribuye al efecto catalizador que ejercen los coloides del suelo (arcilla y humus) en los plaguicidas, es decir los plaguicidas que

se encuentran adsorbidos a los coloides sufren fotodescomposición con mayor rapidez (Navarro y col, 1992).

i) Degradación bioquímica

Las degradaciones microbiológicas y químicas, están íntimamente relacionadas entre sí, debido a que los factores que influyen en cada degradación son comunes. Por esta razón, ambas degradaciones se agrupan y se tratan en conjunto como degradación bioquímica (Navarro y col, 1992). Esta degradación depende, al igual que el resto de los procesos de transformación y degradación, no solo de las características físico-químicas del plaguicida, sino que además de la textura y composición coloidal del suelo, humedad, temperatura, presencia de microorganismos, etc. Las reacciones más frecuentes son hidrólisis, deshalogenación, desalquilación, reducción, oxidación, hidroxilación, condensación, etc.

1.3.2 Propiedades del suelo que determinan la dinámica del plaguicida.

a) Naturaleza coloidal del suelo

El suelo es un sistema disperso constituido por tres fases: sólida, líquida y gaseosa. De estas tres fases, la primera es la que presenta una mayor significancia en la persistencia de los plaguicidas, a través de las fracciones coloidales minerales y orgánicas, representadas por las arcillas y por el humus, respectivamente.

Los componentes coloidales minerales presentan (como resultado de un proceso de edafización de las rocas) un tamaño de partícula inferior a 0,002 mm, debido a ésto presentan una extensa superficie específica, una gran reactividad superficial y por lo tanto son responsables de las interacciones que tienen lugar entre la fase sólida del suelo y los plaguicidas. Los coloides minerales más importantes son los óxidos e hidróxidos cristalinos, amorfos y los minerales de arcilla. Estos últimos pueden sufrir expansión al hidratarse, donde aparece una superficie interna entre la lámina expandida, la cual es accesible a las moléculas del plaguicida. Por lo tanto, la gran superficie que caracteriza a las arcillas, no sólo está producida por su fino estado de división sino que también por su estructura laminar que al hidratarse permite la aparición de superficies internas por expansión de la red.

Otra de las características presentadas por las arcillas que influye en la adsorción y consecuentemente en la persistencia del plaguicida en el suelo, es su carga negativa. Debido a esto presentan gran afinidad por los plaguicidas cargados positivamente, atrayéndolos hacia su superficie e intercambiándolos por aquellos cationes adsorbidos en ellas. El mineral de arcilla más importante en el proceso de adsorción es la montmorrillonita, debido a que posee alta capacidad de intercambio catiónico, área superficial, y por lo tanto gran espacio interlaminar expandible (Navarro y col, 1992).

Los coloides orgánicos, bajo la forma de humus, están constituidos por ácido fúlvico, ácido húmico y humina, dependiendo de su solubilidad en medios ácidos o básicos. Están constituidos por macromoléculas, altamente polimerizadas, con diferentes grupos funcionales, de alto peso molecular y carga superficial negativa que

depende del pH del medio. Poseen en general doble carácter; hidrofóbico e hidrofílico. Presentan además una capacidad de cambio catiónico (entre 200-400 mg g⁻¹), superior al de las arcillas, lo que favorecería el proceso de adsorción en plaguicidas hidrofóbicos, no cargados, en especial con ácidos fúlvicos (Navarro y col, 1992).

b) Humedad, temperatura y microorganismos presentes en el suelo

Estos factores en conjunto, inciden en diversos procesos que afectan al transporte y degradación de los plaguicidas. En el caso de la adsorción, se produce la competencia del plaguicida con el agua por los lugares de adsorción en el suelo a diferentes niveles de humedad. Por lo tanto, cuando el contenido de humedad es bajo, se produce una fuerte retención del agua, (que al ser un compuesto polar, es fuertemente adsorbida por el coloide) y con ello, la adsorción del plaguicida es menor.

Por el contrario, al aumentar la humedad, la adsorción se incrementa, puesto que la mayoría de los plaguicidas son suspendidos en fase líquida. La influencia de la humedad en la actividad microbiana (uno de los principales procesos de degradación de los plaguicidas), es de vital importancia, ya que las condiciones óptimas en las que se desarrolla la actividad microbiana (y por ende la óptima degradación de los plaguicidas) se producen cuando existe en el suelo un 60% de agua respecto al contenido total que el suelo puede almacenar. Condiciones de baja humedad en este aspecto no favorecerían los procesos metabólicos de los microorganismos presentes en el suelo, así como tampoco la degradación química a través de la hidrólisis, donde el agua es utilizada tanto como reactivo y como medio de reacción (Navarro y col, 1992).

1.3.3 Propiedades del plaguicida que determinan su dinámica en el suelo.

a) Distribución de la densidad de carga

Constituye una de las propiedades más importantes en la adsorción del plaguicida. Si la distribución de la densidad de carga en la molécula de plaguicida es uniforme (en el caso de la presencia de anillos aromáticos), se produce una baja polaridad y débil adsorción; por el contrario si la densidad de carga no es uniforme, se puede presentar polarización de la molécula y por lo tanto una mayor probabilidad de adsorción. En general las regiones polares de los plaguicidas tienden a interactuar con los componentes minerales, con el agua y con la porción hidrófila de la materia orgánica. Las regiones apolares de la molécula tienen una mayor afinidad por la porción hidrofóbica de la misma (Navarro y col, 1992).

b) Estructura del plaguicida

La naturaleza de los grupos funcionales, determinan si un compuesto es ácido, básico o anfótero y, de acuerdo a ello también varía el proceso de adsorción. Entre los grupos más abundantes se encuentran: carboxilo ($-\text{COOH}$), carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), hidroxilo ($-\text{OH}$) y amino ($-\text{NH}_2$). La presencia y posición de estos grupos en la molécula afecta su solubilidad en agua y, por consiguiente el proceso de adsorción (Comejo, 2001).

c) Tamaño molecular del plaguicida

El principal efecto se identifica en la adsorción del plaguicida en la superficie interlaminar de las arcillas expandibles, donde las moléculas de mayor tamaño son difícilmente fijadas en comparación a sus pares de menor tamaño, debido a las diferencias de área interfacial. A igualdad de masas, los sistemas constituidos por partículas de menor tamaño presentan una mayor área interfacial (Cornejo, 2001).

d) Solubilidad del plaguicida

Los plaguicidas muy solubles en agua se adsorben con baja afinidad a los suelos y por lo tanto, son fácilmente transportados desde el lugar de la aplicación, (debido a la lluvia, riego o escurrimiento), hasta los cuerpos de agua superficial y/o subterránea. Los plaguicidas con solubilidad en agua mayor a los 500 mg L⁻¹, son elementos muy móviles en los suelos, mientras que las sustancias que presentan solubilidad menor a 25 mg L⁻¹, tienden a inmovilizarse en los suelos y por lo tanto a concentrarse en los organismos vivos (Cornejo, 2001).

e) Coeficiente de partición Octanol/agua del plaguicida (Kow)

Indica la hidrofobicidad de una molécula y es un parámetro clave para determinar el destino del plaguicida en el suelo. Es una medida de la tendencia de un compuesto para separarse entre una fase orgánica y una acuosa. Los plaguicidas con valores bajos de Kow (<10) se consideran relativamente hidrofílicos, mientras que los plaguicidas que presentan un Kow alto (>10⁴) son considerados hidrofóbicos y tienden

a acumularse en las superficies orgánicas de los suelos con alto contenido de materia orgánica, además de bioacumularse en la grasa corporal de los animales, constituyendo un riesgo para la salud de las personas, al incorporarse a través de ellos, a la cadena alimenticia (Cornejo, 2001).

f) Presión de vapor del plaguicida

Determina la velocidad de volatilización del plaguicida y varía proporcionalmente con la temperatura. Un plaguicida con presión de vapor alta ($>10^{-3}$ mm Hg) puede volatilizarse fácilmente y alejarse rápidamente del lugar donde se aplicó, mientras que los plaguicidas con presión de vapor baja (10^{-4} - 10^{-8} mm Hg) tienen bajo potencial para volatilizarse, y por lo tanto presentan mayor persistencia en el suelo (Cornejo, 2001).

g) Coefficiente de adsorción Koc

Representa la tendencia de un plaguicida a ser adsorbido (retenido) por la materia orgánica del suelo y/o sedimentos, siendo específico para cada plaguicida. Los valores del Koc se extienden de 1 a 100.000. Un Koc bajo, es decir entre 1-1000, indica que el plaguicida, al ser levemente retenido por el suelo, puede lixiviar hacia cuerpos de agua subterráneos, mientras que un Koc elevado (entre 1000 -100.000) indica que el plaguicida orgánico se fija con firmeza al suelo principalmente a través de la materia orgánica, siendo poco probable que el compuesto se mueva hacia aguas superficiales o subterráneas (Cornejo, 2001).

1.4 Persistencia de los plaguicidas

La persistencia se define como la capacidad del plaguicida para retener sus características físicas, químicas y actividad biológica en el medio en el cual es transportado o distribuido, por un período limitado después de su aplicación.

El concepto de persistencia está a menudo relacionado con el tiempo de permanencia o residencia de un plaguicida en un determinado compartimento ambiental, debido a su resistencia a la degradación ya sea química o biológica. A mayor tiempo de residencia, mayor es la persistencia del plaguicida.

Las consecuencias de la persistencia de un plaguicida son muy importantes, dependiendo de la toxicidad y también de su biodisponibilidad. La persistencia de un plaguicida en el suelo es difícil de predecir, ya que no es una característica fija, sino que es controlada por las dinámicas del plaguicida en el suelo, es decir puede variar de un lugar a otro y también en un mismo lugar de un periodo a otro.

Una de las formas de entregar un indicador de la persistencia de un plaguicida es a través de la vida media o $T_{1/2}$, en la cual una vida media corta (es decir pocos días) generalmente no produce una acumulación significativa del plaguicida en el ambiente. Contrario a esto un plaguicida con una vida media mayor puede constituir una acumulación significativa de éste en la cadena alimenticia (Kogan y Pérez, 2003).

1.4.1 Concepto de vida media o $T_{1/2}$

La vida media o $T_{1/2}$ corresponde al tiempo (días, meses, años) que el plaguicida tarda en disipar el 50% de la cantidad inicialmente aplicada (Navarrete, 1995, Kogan y Pérez, 2003). El criterio utilizado por el Convenio de Estocolmo para considerar una sustancia como persistente es que su tiempo de vida media en suelo o sedimentos sea mayor a 6 meses.

Los modelos propuestos para estudiar la desaparición de los plaguicidas en los suelos, se basan en considerar que depende de una sola variable; la concentración. Estos modelos establecen una relación de dependencia de la velocidad de degradación con la concentración existente del plaguicida en un determinado tiempo (Navarro y col, 1992).

Para ello, se utiliza la relación fundamental de la cinética química en fase homogénea:

$$dC/dt = -k * C^n$$

Donde C es la concentración del plaguicida en el tiempo t, k es la constante de velocidad y n es el orden de la reacción. Al considerar como factor limitante solamente la concentración del plaguicida, la reacción de degradación es de primer orden, por lo tanto para calcular $T_{1/2}$ se puede utilizar la siguiente ecuación:

$$C_t = C_o * e^{-kt} \quad (1)$$

Donde C_t es la concentración en el tiempo t , C_o es la concentración inicial del plaguicida, y k es la constante de primer orden de degradación (tasa de degradación), correspondiente a la pendiente de la curva al graficarla logarítmicamente. Luego integrando resulta:

$$\ln (C_t/C_o) = k * t$$

$$\frac{\ln (C_t/C_o)}{K} = t$$

Como $(C_t/C_o) = 2$ cuando $t_{1/2}$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (2)$$

Es importante mencionar que el $T_{1/2}$ de un plaguicida es un indicador de la velocidad de degradación del mismo y no de su efectividad plaguicida. Así la relación entre la eficacia del plaguicida y el $T_{1/2}$ variará según la susceptibilidad de la plaga.

Para predecir la persistencia de los plaguicidas en el suelo en diferentes condiciones, se debe conocer primero como la tasa de degradación es afectada por las condiciones del suelo y las características del plaguicida (Kogan y Pérez, 2003).

1.5 Metodologías de estudio de plaguicidas

Desde hace años se han desarrollado metodologías analíticas de detección y cuantificación de plaguicidas para describir su comportamiento y destino final en el ambiente, antecedentes que han sido recopilados mediante metodologías convencionales, según la información establecida por los fabricantes. No obstante, esta información recopilada a través de dichas metodologías suele presentar algunas limitaciones, ya que no permite detectar, ni cuantificar residuos de plaguicidas en bajas concentraciones. Otro agravante de la situación es la presencia de formulaciones que contienen mezclas de plaguicidas pertenecientes a diversas familias químicas y además, el surgimiento de una gran variedad de productos sintéticos de distinta naturaleza que día a día va en aumento (Cuidad, 1990).

Por lo tanto, y debido también a las particulares condiciones edafológicas de nuestro país, se hace necesario estudiar el comportamiento, degradación y residualidad, de acuerdo a nuevas técnicas, complementarias a las metodologías convencionales, sin las limitaciones antes mencionadas.

1.5.1 Metodologías convencionales

Entre las principales técnicas recomendadas por la Environmental Protection Agency (EPA) para la determinación de contaminantes orgánicos en tejidos y muestras ambientales se encuentran la Cromatografía de Gases (CG), la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Electroforesis Capilar (EC).

Actualmente la Cromatografía de gases es el método más ampliamente empleado para el análisis multiresidual de plaguicidas, con la ventaja de lograr límites de detección muy bajos y alta sensibilidad del orden de 10^{-8} – 10^{-15} g dependiendo del tipo de detector. Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica con detectores de nitrógeno y fósforo (NPD), de captura de electrones (ECD), de ionización de llama (FID), fotométrico de llama (FPD) o de espectrometría de masa (MS). Sin embargo los análisis de compuestos de alta masa molar, polares o térmicamente lábiles presentan grandes dificultades o son prácticamente imposibles de analizar mediante CG. Es por esto que el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es ampliamente usado en estos casos. Esta técnica posee alta sensibilidad (10^{-8} – 10^{-12} g) y la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre y post columna de los plaguicidas con problemas de detección. Los detectores más utilizados son el ultravioleta con longitud de onda fija (UV) y variable (detector de arreglo de diodos, DAD), aunque cada vez es mas habitual la detección mediante Espectrometría de Masas (MS). Sin embargo, aunque estas técnicas son las principales en el análisis de plaguicidas, se ha desarrollado en los últimos años, otra técnica de análisis, la Electroforesis Capilar, basada en el transporte iónico, bajo la acción de un campo eléctrico y un disolvente que se encuentra en el interior de una columna capilar (EPA, 1980, Skoog y Leary, 1991).

1.5.2 Metodologías isotópicas

Con la aplicación de técnicas nucleares, mediante el uso de moléculas marcadas, es posible evaluar y seguir la trayectoria de un plaguicida en diferentes sistemas ambientales, con la ventaja de identificar y cuantificar en forma precisa, tanto el ingrediente activo, como sus metabolitos, en concentraciones muy bajas, donde la metodología es altamente específica, sensible y rápida (OIEA, 1990).

El contar con técnicas rápidas y altamente sensibles (10^{-9} - 10^{-12} g) permite ampliar los programas de monitoreo de plaguicidas en aguas y suelos, contando con un gran número de análisis de muestras en un menor tiempo.

Los métodos basados en los isótopos radiactivos han sido muy útiles en la investigación agrícola y un logro en el aumento de producción mundial de alimentos hasta el nivel que tenemos hoy. Estos métodos se aplican en fitonutrición, fertilidad de los suelos, lucha contra plagas, conservación de alimentos, estudios sobre residuos de plaguicidas, etc., y juegan un rol fundamental en el aumento de la producción de alimentos en el mundo (FAO/OIEA, 2001).

No obstante, la planificación de los estudios realizados con ayuda de isótopos radiactivos requiere de un procedimiento diferente del que se sigue en el diseño de pruebas con plaguicidas normales, debido al costo y suministro de los materiales marcados con isótopos, y las correspondientes consideraciones y reglas básicas de protección radiológica para trabajo en laboratorio (Anexo II).

Isótopos estables y radiactivos

Casi todos los elementos de importancia en la investigación biológica tienen al menos dos isótopos estables, de los cuales el isótopo de mayor masa atómica se presenta de manera natural solo en pequeñas cantidades, en comparación a la alta abundancia presentada por los isótopos estables de menor masa atómica.

Los isótopos radiactivos o radioisótopos, si bien, se comportan químicamente del mismo modo y presentan propiedades idénticas a los isótopos estables, solo difieren en la masa atómica, ya sea siendo más livianos o más pesados (OIEA, 1990).

Con el tiempo, todos los radioisótopos se desintegran exponencialmente. Mediante esta desintegración nuclear es que se emite la radiación ionizante en forma de partículas alfa (α), beta (β) y rayos gamma (γ), por lo tanto para la elección de un radioisótopo trazador se deben considerar factores como el periodo de semidesintegración o la vida media (tiempo necesario para que la mitad de los átomos radiactivos iniciales se desintegren y pierdan su reactividad), tipo de radiación ionizante, y la disponibilidad del trazador, es decir, la cantidad requerida y el valor económico del radioisótopo (FAO/OIEA, 2001). Tanto los isótopos estables, como los radioisótopos suelen utilizarse como trazadores, representando una forma eficaz de obtener una medida cuantitativa de la presencia de un agroquímico en el suelo.

Isótopos de Carbono (C)

En el caso del carbono, uno de los principales macro nutrientes de la planta, el isótopo estable pesado es el ^{13}C (1,108% abundancia natural) y el isótopo estable ligero es el ^{12}C (98,892% abundancia natural) (OIEA, 1990).

El ^{14}C es un radioisótopo del carbono, utilizado como trazador, que posee una masa un poco mayor a la presentada por el isótopo estable, pero que se comporta de manera idéntica en los sistemas ambientales. El tiempo ($t_{1/2}$) que demora en reducir su actividad a la mitad es de 5720 años, con un decaimiento radiactivo de tipo β débil, esto significa que durante el proceso radiactivo, el núcleo del átomo expulsa un electrón (partícula β), con una intensidad energética de 0,156 Mev de baja energía, la cual pierden lentamente, siendo detenidas por delgadas capas de metal o plástico (OIEA, 1990).

Las principales características del ^{14}C , y el resto de los isótopos del carbono utilizados como trazadores, se indican en la siguiente tabla (tabla 4).

Tabla 4: Principales isótopos trazadores que se emplean en los estudios sobre la relación suelo-planta (OEIA, 1990).

Isótopo más abundante	Isótopo trazador	Características	Aplicaciones típicas
^{12}C	^{11}C	Radiactivo, $T_{1/2} = 20,5$ meses, emisión β (1Mev)	Limitadas a causa de su periodo de desintegración corto
	^{12}C	Estable, abundancia natural = 98,892%	Trabajos sobre los mecanismos de reacción orgánica
	^{13}C	Estable, abundancia natural = 1,108% Detección de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ por MS	Estudios de las materias orgánicas del suelo en los ecosistemas, fotosíntesis.
	^{14}C	Radiactivo, $T_{1/2} = 5720$ años, emisor β (0,156 Mev) recuento por CCL	Fotosíntesis y transformación de C por las plantas. Estudio sobre las materias orgánicas del suelo, balance de C.

Instrumentación: Contador de Centelleo Líquido

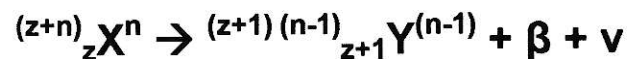
Los contadores de centelleo líquido (CCL) en la investigación científica, constituyen la herramienta más difundida para la cuantificación de radioisótopos β debido a su alta eficiencia de detección, la facilidad en la técnica de preparación de muestras, la automatización en el tratamiento de datos, y la determinación simultánea de diferentes radionúclidos.

El aparato de centelleo está constituido por un porta muestras en el cual la muestra se resguarda de la luz en un fotocátodo, que capta y amplifica los fotones emitidos por el medio centellador, el que a su vez ha sido excitado por las partículas β . Para evitar reacciones eléctricas y parasitarias se ubican dos fotocátodos en coincidencia. Esto significa que solo son tomados en cuenta los impulsos detectados por los dos fotocátodos simultáneamente. El resto del aparato está constituido por un sistema de tratamiento de los electrones emitidos por el fotocátodo.

La técnica se basa en que ciertos compuestos orgánicos emiten luz fluorescente al ser bombardeados por una radiación nuclear. La fluorescencia o fotones emitidos por estos compuestos orgánicos (líquidos centelladores, por ejemplo Xileno o Tolueno) como resultado de la excitación, pueden ser rápidamente convertidos en un flujo de electrones por medio de un tubo fotomultiplicador, y posteriormente medidos como pulso eléctrico (Skoog y Leary, 1991).

Fundamento del Centelleo Líquido

Los isótopos radiactivos son inestables debido a que sus núcleos poseen un exceso de neutrones. La estabilización de este tipo de átomos origina una transformación a nivel nuclear o decaimiento radiactivo, que involucra la emisión de un electrón o partícula β , de energía característica, aumentando así el número de protones del átomo original y disminuyendo el número de neutrones, tal como se muestra en la siguiente reacción (Poblete, 1989).



Las partículas β emitidas son de distintas energías comprendidas entre 0 y E máximo (eV) dependiendo del elemento (por ejemplo 0,018 MeV para ${}^3\text{H}$, 1,708 MeV para ${}^{32}\text{P}$ y 0,156 MeV para ${}^{14}\text{C}$). Entre estos valores se observará una distribución continua de la energía de las partículas emitidas, equivalente al cambio de masa que ocurre durante la reacción nuclear.

Como producto de este decaimiento radiactivo, las partículas β emitidas excitan las moléculas del líquido centellador (disolvente) y le transfieren su energía. El número de moléculas excitadas es directamente proporcional a la energía inicial de decaimiento radiactivo de la partícula. Dicha energía de decaimiento es transferida entre las moléculas del disolvente, y luego transferida a las moléculas fluorescentes, también presentes en el líquido centellador, mientras las moléculas de disolvente regresan al estado basal.

Las moléculas fluorescentes excitadas resultantes posteriormente también regresan al estado basal, restituyendo al medio ambiente la energía captada como una emisión de fotones o fluorescencia, que finalmente es detectada, como ya se mencionó, por un tubo fotomultiplicador, para convertirlos en pulsos eléctricos medibles (Figura 7).

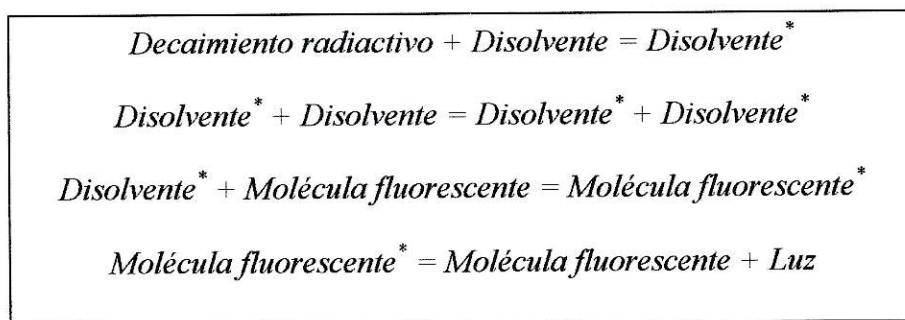


Figura 7: Secuencia de decaimiento radiactivo (Poblete, 1989).

Sin embargo, a pesar de que la emisión de luz esta directamente relacionada y es proporcional a la radiactividad de la muestra, existen interferencias asociadas que reducen la cantidad de luz que es emitida, y por lo tanto inciden en la veracidad de las mediciones.

La interferencia principal que se presenta en este tipo de mediciones, es la llamada "extinción o inhibición química", causada por compuestos presentes en los líquidos centelladores (O₂, H₂O, emulsificadores, etc.). Este tipo de extinción interfiere en la transferencia de energía desde el decaimiento radiactivo hasta el disolvente, y desde éste hacia la molécula fluorescente, dando como resultado un menor número de centelleos ó de fotones emitidos por la muestra, registrados como cuentas por minuto (cpm) y expresados por el contador en desintegraciones por minuto (dpm), corregido a través de la eficiencia de conteo (OIEA/FAO, 1992).

Esta memoria de título es parte del proyecto CHI/5/022 "Detección de los niveles de plaguicidas en aguas y suelos agrícola-forestales de la VI, VII y VIII Regiones de Chile", que se inició el año 2003, patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), con la participación del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN, CEN La Reina), Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, CRI La Platina) y la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Facultad de Ciencias Agronómicas. La empresa ANASAC participa en el proyecto mediante un convenio de cooperación con la Sección Agricultura (SA) de la CCHEN.

Finalmente y sobre la base de los antecedentes presentados en esta sección, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis

El insecticida Clorpirifos (^{14}C) puede ser identificado y cuantificado en muestras de suelo, utilizando técnicas isotópicas, y con ello, determinar la influencia de la humedad en la vida media del insecticida en un suelo agrícola de la VI Región, considerando factores medioambientales específicos del sitio como pH, materia orgánica, contenido de arcillas y microorganismos presentes, además de las propiedades físico-químicas del plaguicida.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la influencia de la humedad sobre la vida media del insecticida Clorpirifos en un suelo agrícola de la VI Región, mediante uso de Técnicas Isotópicas.

Objetivos Específicos

- 1) Evaluar y analizar la influencia de parámetros como pH, MO, microorganismos presentes y humedad, sobre la vida media del insecticida Clorpirifos en un suelo agrícola de la VI Región, según los requerimientos del presente estudio.
- 2) Aplicar Técnicas Isotópicas con el uso de isótopos radiactivos para la determinación de vida media del insecticida Clorpirifos usando ^{14}C .
- 3) Determinar y comparar la vida media de Clorpirifos, en dos condiciones diferentes de humedad de suelo (50% y 75% de la CC) a una temperatura constante (20°C).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de muestras de suelo

Las muestras de suelo que se utilizaron en este estudio fueron recolectadas en la localidad de El Olivar, VI Región (Figura 8). A la fecha de recolección de las muestras (Marzo, 2004), el suelo se encontraba bajo plantación de vides (Variedad Ribier). Las muestras recolectadas corresponden específicamente al suelo entre las hileras 39-40 de la plantación (Figura 9).

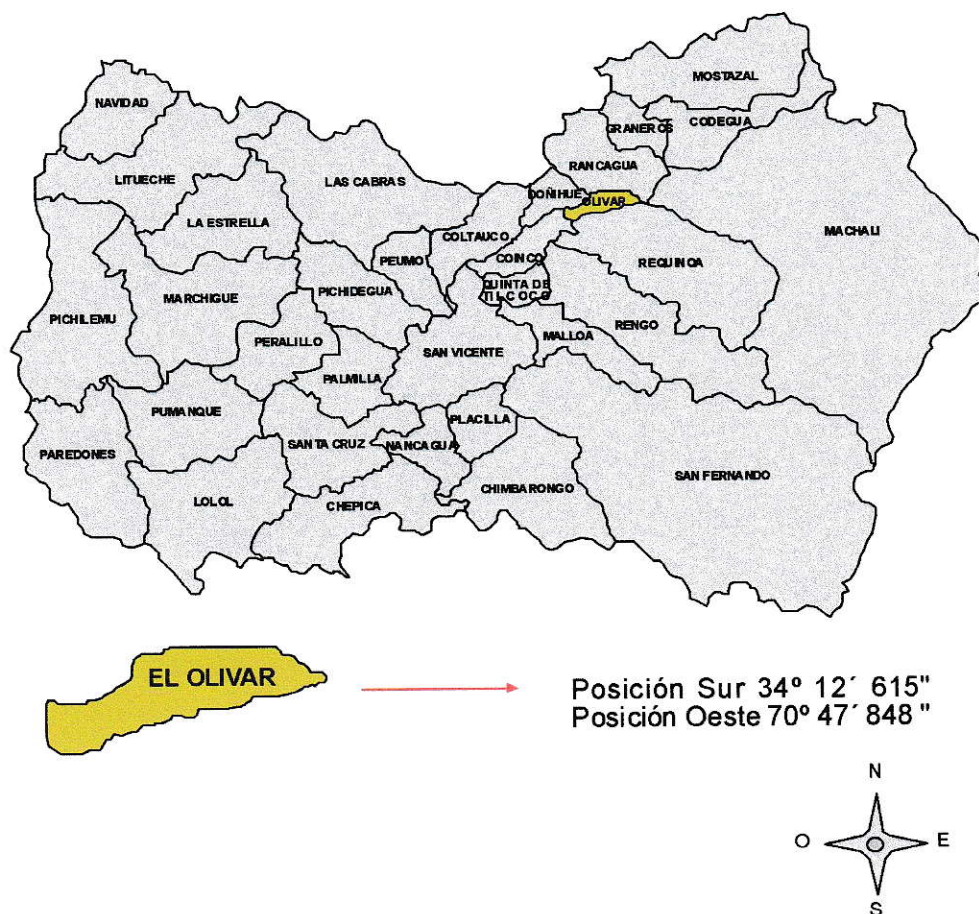


Figura 8: Localidad El Olivar, VI Región.



Figura 9: Plantación de vides variedad Ribier (Hileras 39-40).

Las muestras de suelo fueron secadas al aire y tamizadas (< 2 mm).

Corresponden al horizonte Ap, es decir suelo que ha sido arado en los primeros cm.

i) Clasificación del Suelo Serie O`Higgins (CIREN-Chile, 2002)

Familia:	Limosa gruesa, mixta, térmica.
Serie:	O`Higgins
Clasificación:	<i>Fluventic Haploxerolls</i>
Drenaje:	Bueno a moderado
Temperatura:	Media Anual varía entre 15°C y 16°C
Material Parental:	Terrazas Aluviales

ii) Características físicas y morfológicas del horizonte Ap (0-17 cm)

Se trata de un horizonte de color pardo grisáceo muy oscuro (10YR3/2) en húmedo, franco arcilloso, plástico, ligeramente adhesivo, firme y duro; de estructura en bloques subangulares gruesos y fuertes. Las raíces presentes son finas y escasas, además posee grietas verticales de 1 cm de profundidad que terminan en el horizonte, con poros finos escasos. Límite abrupto lineal. En la base del horizonte hay una estrata de 2 a 3 cm de arena gruesa, grano simple (denominado también lente de arena) (CIREN-Chile, 2002).

3.2 Plaguicida utilizado en este estudio

Para este estudio se utilizó insecticida Clorpirifos comercial sin marcar, de calidad analítica, el cual presenta una masa molar de 350,59 g mol⁻¹ y una pureza de 99%, dado por el fabricante (Chem Service Inc, USA).

También se utilizó insecticida Clorpirifos marcado con ¹⁴C (Figura 10) en el grupo Etilo (¹⁴C- Clorpirifos [Etil-1-¹⁴C]), de actividad total 9,25 MBq ml⁻¹, actividad específica de 8,3 mCi mol⁻¹ y pureza >95% (Institute of isotopes Co, Ltd Hungría).

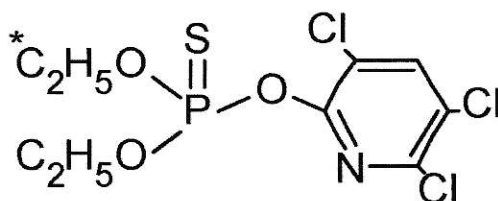


Figura 10: Estructura química de ¹⁴C- Clorpirifos [Etil-1-¹⁴C].

3.3 Determinación de parámetros del suelo a estudiar

Se realizó la determinación de algunos parámetros del suelo a estudiar considerando humedad, materia orgánica y pH.

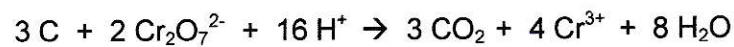
3.3.1 Determinación de humedad inicial

Para la determinación de humedad inicial se masó en triplicado, entre 10-20 g de suelo seco al aire (balanza analítica Industry 12000 g/1 g) en una cápsula de aluminio previamente tarada. Las muestras de suelo se secaron (Estufa Kottermann modelo 2771) a 105°C, semi-tapadas, durante 24 h. Pasado este periodo de tiempo, se dejaron enfriar y finalmente se masaron (Sadzawka, 2004).

3.3.2 Determinación de Materia Orgánica

La materia orgánica del suelo se determinó de acuerdo al procedimiento de Walkley y Black (Sadzawka, 2004), que consiste en la combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado.

La determinación se basa en la oxidación del carbono orgánico fácilmente oxidable por dicromato de potasio tal como se muestra en la siguiente reacción, donde la cantidad de iones Cr (III) producidos, es directamente proporcional a la cantidad de carbono (C) oxidado.



Se preparó una curva de calibración con estándares de Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Merck p.a) preparados en un rango de concentración entre 0-50 mg de Carbono mL^{-1} con agua destilada. Para determinar la materia orgánica se masaron entre 700-800 mg de suelo seco al aire (balanza PRECISA tipo 100A-300M) en cuadruplicado, en matraces erlenmeyer de 150 mL, incluyendo dos blancos (matraz erlenmeyer sin suelo). A cada matraz se le agregó 1 mL de la serie de estándares de Sacarosa. Luego se agregaron 10 mL de solución de dicromato de sodio de concentración 0,5 mol L^{-1} . A continuación bajo campana y agitación se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 96%).

Luego de agitar las muestras, se dejó reposar bajo campana, cubiertas con vidrios de reloj, sobre una plancha aislante durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 70 mL de agua destilada, y se dejó reposar nuevamente, esta vez durante toda la noche.

Después de la reacción, cada muestra se midió colorimétricamente. Para ello se empleó un espectrofotómetro de rango visible con cubetas de 10 mm de paso de luz (UNICAM UV/Vis Spectrometer UV 2), y se leyó la máxima absorbancia a 600 nm del sobrenadante claro, sin disturbar el sedimento del fondo de cada matraz.

La cuantificación de carbono orgánico se realizó a través de una curva de calibración preparada con estándares de Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) en rango de concentraciones de Carbono de 0-50 mg L^{-1} . Finalmente para determinar el porcentaje de materia orgánica que contenía el suelo, se multiplicó el valor de carbono orgánico por el factor 1,72 (Anexo V).

3.3.3 Determinación de pH en agua y CaCl₂

Para la determinación del pH, se masó, en duplicado, 20 g de suelo seco al aire (balanza analítica Industry 12000 g/1 g) en recipientes plásticos de 100 mL. A dos de estos frascos plásticos se les agregó 50 mL de agua desionizada y a los dos restantes se les agregó 50 mL de CaCl₂ 0,01 M, preparado previamente disolviendo 0,22 g de CaCl₂ en 200 mL de agua desionizada. Es decir se prepararon suspensiones de suelo-agua y suelo-disolución de CaCl₂ en una proporción suelo:disolución de 1:2,5 (Sadzawka, 2004). Las muestras de suelo se agitaron en agitador (Gerhardt) a 150 rpm/min, durante cinco minutos. Luego de la agitación, los frascos se dejaron reposar por 3 horas.

Pasado este periodo de tiempo, la medición de pH se realizó en la disolución, con un medidor de pH con ajuste de pendiente y control de temperatura (pH meter Handylab 1), previamente calibrado.

3.4 Determinación de la eficiencia de conteo del equipo contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000 TD)

Debido a los interferentes químicos que presentan las muestras a analizar, es necesario corroborar el correcto funcionamiento del equipo contador de centelleos, y expresar los datos obtenidos en unidades que permitan independizarse del grado de interferencia de cada muestra.

Para corroborar el correcto funcionamiento del contador de centelleo, se determinó la eficiencia de conteo a través de la construcción de la curva de Quenching Químico. Para ello, se dispuso de 10 viales de vidrio a los cuales se les agregó 10 mL de líquido centellador (Ultima Gold LLT), una cantidad creciente de interferente químico, CCl_4 (Merck p.a), entre 0-400 μL , y finalmente 0,2 mL de estándar de C-14 a cada vial (STD, de preparación descrita en 3.5.1). Cada vial fue agitado y llevado a conteo durante 10 minutos.

Con los datos obtenidos el instrumento calcula un factor de corrección, denominado Hf para cantidades de interferente específico en una muestra y asigna un % de eficiencia de conteo a cada medición. Los resultados obtenidos, se expresan a través de la curva de Quenching Químico, graficando % de eficiencia versus el factor de corrección Hf.

3.5 Determinación de vida media insecticida Clorpirifos ($T_{1/2}$)

La determinación de la vida media del insecticida se realizó mediante un ensayo de 110 días de duración, durante el cual se incubaron las muestras de suelo con el insecticida Clorpirifos, a 20°C y oscuridad completa, determinando la concentración del insecticida remanente en el suelo a diferentes tiempos, a través de muestreos periódicos y estableciendo mediante técnicas isotópicas el tiempo que tarda el insecticida en reducir a la mitad la concentración inicialmente aplicada ($T_{1/2}$).

3.5.1 Preparación de disoluciones

i) Preparación de disolución estándar de Clorpirifos marcado (STD)

A partir de una solución inicial de Clorpirifos marcado (^{14}C -CLP) de concentración $1,64 \text{ mg mL}^{-1}$, se preparó una disolución estándar de concentración $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$, tomando para ello (micropipeta de desplazamiento positivo, Microman Precisión microliter pipette) $15 \mu\text{L}$ de la solución (^{14}C -CLP) y aforando a 5 mL con isooctano (Merck p.a. pureza $\geq 99.5 \%$, Merck). A esta disolución se le denominó STD.

ii) Preparación de disolución de Clorpirifos para fortificar el suelo (CLP-E).

Para la fortificación del suelo bajo estudio se preparó una disolución fortificante, mezcla de Clorpirifos sin marcar y Clorpirifos marcado con ^{14}C , denominados CLP y ^{14}C -CLP respectivamente. Basado en la dosis de aplicación comercial por cada 1000 g de suelo se aplicó 10 mg de insecticida.

Para ello, se tomó 1,93 mL de CLP (concentración 14 mg mL⁻¹) y 157 µL de ¹⁴C-CLP (1,64 mg mL⁻¹), volúmenes que fueron aforados a 25 mL de isooctano. La disolución se preparó en duplicado y se le denominó CLP-E.

3.5.2 Fortificación del suelo con insecticida Clorpirifos

Se realizó la fortificación de 5400 g de suelo con la disolución antes mencionada, el cual fue dispuesto en 2 bandejas de vidrio (pirex), con 2700 g de suelo cada una.

Para una fortificación homogénea, los suelos fueron divididos en cuadrantes (100 cuadros por bandeja) y los 25 mL de solución fortificante, fueron agregados lentamente, cuadrículado por medio, en pequeñas alícuotas de 250 µL (micropipeta de desplazamiento positivo, Microman Precisión microliter pipette) (Figura 11).



Figura 11: Fortificación del suelo Serie O`Higgins.

Con la finalidad de verificar la aplicación del volumen completo del insecticida en el suelo, se realizaron repetidos lavados del matraz, con isooctano, con alícuotas de 2 mL, en 10 repeticiones de lavado, siguiendo con el orden de la aplicación para cada cuadrículado.

Las bandejas se dejaron bajo campana a temperatura ambiente por un par de horas, para permitir la evaporación del isooctano. Pasado este periodo se trasladó el suelo de cada bandeja a un envase plástico, y se llevó al homogeneizador de tipo pantalón (24 vueltas/min) por 48 h (Figura 12).

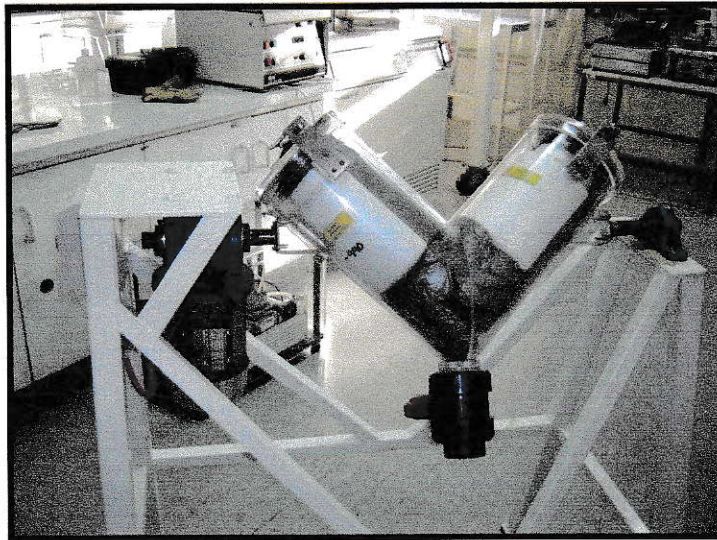


Figura 12: Homogeneizador tipo pantalón.

3.5.3 Incubación de las muestras de suelo

Una vez verificada la homogenización de los suelos (Anexo V), se procedió a la incubación de las muestras. Para ello 100 g de suelo se colocaron en frascos de vidrio con tapa hermética de 750 mL de capacidad, definiéndose dos tratamientos de humedad.

i) Tratamientos de humedad

Los frascos correspondientes al tratamiento 1 (T1), fueron etiquetados del 1 al 26 y llevados a 50% de la capacidad de campo del suelo (Anexo III) agregando para ello 11 mL de agua destilada mediante diferencia de masa. De igual manera, los frascos correspondientes al tratamiento 2 (T2), fueron etiquetados del 27 al 52 y llevados a 75% de la capacidad de campo, esta vez agregando 18 mL de agua destilada. La humedad se controló semanalmente, por diferencia de masa a lo largo de todo el período del ensayo, al igual que la aireación periódica de las muestras. Los frascos de ambos tratamientos fueron dispuestos al azar en incubadora (Sanyo Incubator MIR-253, capacidad de incubación de 253 L), a temperatura constante (20°C) y a oscuridad completa, para evitar la posible fotodescomposición del insecticida (Figura 13).



Figura 13: Incubación de las muestras de suelo (Incubadora Sanyo Incubator MIR-253).

3.5.4 Determinación de Clorpirifos residual en el suelo

Para determinar los residuos totales del insecticida (14 Clorpirifos residual), se retiraron de la incubadora muestras de suelo en duplicados para cada tratamiento, a intervalos de tiempo regulares, las cuales se secaron a 40°C (Estufa Kottermann 2771), por 24 h (Figura 14).

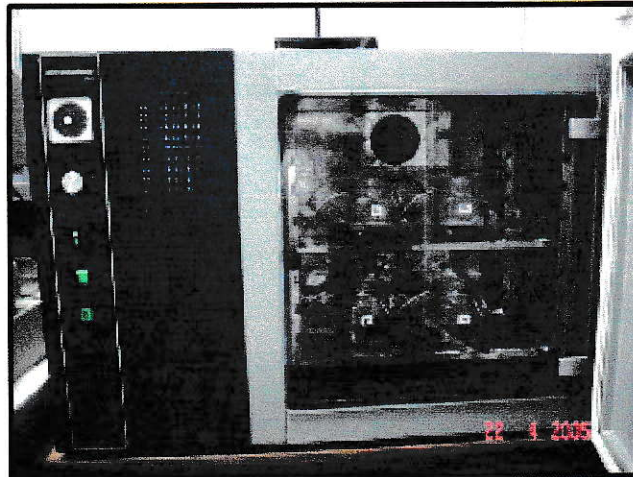


Figura 14: Secado de muestras en estufa (Kottermann 2771).

Pasado este periodo, se masó (balanza PRECISA tipo 100A-300M) en cuadruplicado 0,5 g de suelo, previamente seco y homogeneizado, más 50 mg de Manitol (Merck p.a.), en cubetas de porcelana. Como blanco de la medición se empleó 50 mg de Manitol, el cual fue masado en cubetas de porcelana, en duplicado, de la misma manera que las muestras de suelo.

Las cubetas fueron llevadas por medio de una cuchara de cuarzo al oxidizador biológico (Biological Oxidizer OX 500), con objeto de realizar una combustión completa de la muestra de suelo a una temperatura de 900°C, donde el producto principal de la combustión es $^{14}\text{CO}_2$ (Figura 15).



Figura 15: Oxidizador Biológico (Biological Oxidizer OX 500) (A) Cuchara de cuarzo (B).

Luego de la combustión, las muestras se recibieron en viales de vidrio los cuales contenían 20 mL de líquido de centelleo cocktail de Xileno (Carbon-14), el cual se agrega debido a la baja energía de la radiación (tipo β) emitida por las desintegraciones de la muestra. El cocktail de Xileno ayuda de esta manera a hacer más eficientes las cuentas en el contador de centelleos, al transformar la energía radiactiva de la muestra en luz.

Para determinar el correcto funcionamiento del equipo Oxidizador (Factor de combustión, FC), se combustionó, en duplicados, 10 μ L de estándar (STD), depositados en una lámina de papel filtro (3x1 cm), dentro de una cubeta de porcelana. Luego de la combustión las muestras se recibieron en viales de vidrio con 10 mL líquido de centelleo cocktail de Xileno (Carbon-14) y fueron llevadas al contador de centelleos. En forma paralela 10 μ L de estándar (STD) en duplicado, fueron depositados directamente a viales de vidrio, junto a 10 mL de líquido de centelleo (Ultima Gold LLT, el cual cumple igual función que el cocktail de Xileno) y llevados al contador de centelleo líquido.

A continuación estos viales se llevaron a conteo al contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000 TD) (Figura 16), donde el número de centelleos de luz que se han emitido producto de las desintegraciones (con la ayuda del líquido centellador) son detectados en un tubo fotomultiplicador y a su vez convertidos en impulsos eléctricos que son amplificados y contados. De esta manera el contador de centelleo líquido informa la cantidad de desintegraciones por minuto (dpm), que registró cada muestra, cuantificando así el Clorpirifos residual en las muestras de suelo.



Figura 16: Contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000 TD).

3.6 Recuento microorganismos aeróbios mesófilos (RAM)

3.6.1 Incubación de las muestras de suelo

Para la incubación de las muestras de suelo, se procedió de la misma forma que para la determinación de la vida media de Clorpirifos (3.5.3). Para ello 100 g de suelo previamente fortificado con CLP, fueron puestos en frascos de vidrio con tapa hermética de 750 mL de capacidad, con los mismos tratamientos de humedad anteriores.

i) Tratamientos de humedad

Los frascos correspondientes al tratamiento 1 (T1), fueron etiquetados como 1-50%, 2-50%, 3-50%, en duplicados y llevados a 50% de la capacidad de campo. De igual manera, los frascos correspondientes al tratamiento 2 (T2), fueron etiquetados como 1-75%, 2-75%, 3-75%, en duplicados, y llevados a 75% de la capacidad de campo.

El tratamiento y control de humedad fue realizado de acuerdo a 3.5.3.

3.6.2 Recuento microbiológico de suelos

El recuento de microorganismos Aeróbios Mesófilos, se realizó, en tres ocasiones para cada tratamiento. Se retiraron muestras de suelo de la incubadora en duplicados al inicio del ensayo (T_0), al momento de alcanzar el 50% de disipación del insecticida Clorpirifos para cada tratamiento ($T_{1/2}$) y al finalizar el ensayo de vida media (T_f).

El recuento microbiológico de las muestras de suelo se realizó en el laboratorio de microbiología de la CCHEN, de acuerdo al Manual Bacteriológico Analítico (BAM on line, 2003), el cual informó acerca de las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (ufc/g), en cada muestra, para cada tratamiento.

El método BAM consistió en diluir 25 g de suelo fortificado en 225 mL de agua peptonada 0,1 % estéril (WP). De esta disolución se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se diluyó en un tubo de ensayo junto a 9 mL de WP. El tubo de ensayo se agitó (agitador vortex) y de inmediato, de este tubo de ensayo se tomó 1 mL de disolución, para diluir nuevamente en otro tubo con 9 mL de WP, realizando en total 6 diluciones consecutivas, de manera que se consigue un número de microorganismos factible de contar.

Posteriormente se sembró en placa de petri, en duplicado, 1 mL de las últimas tres diluciones en Agar de Soya Trypticasa (CASO) siendo cultivadas por 48 horas a $35\pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente se realizó el recuento de microorganismos directamente en la placa, expresado en ufc por gramo de muestra de suelo.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de parámetros físico-químicos del suelo Serie O'Higgins

Previa a la aplicación del plaguicida Clorpirifos, el suelo de la Serie O'Higgins, fue caracterizado de acuerdo a los siguientes parámetros físico-químicos (Tabla 5).

Tabla 5: Parámetros físico-químicos del suelo Serie O'Higgins.

Parámetros	Suelo Serie O'Higgins
Humedad (%)	3,9
Materia Orgánica (%)	4,9
pH (H ₂ O)	7,2
pH (CaCl ₂)	6,6

De acuerdo a estos resultados, se observa que el suelo en estudio seco al aire, presenta un bajo contenido de humedad (3,9%), mientras que el porcentaje registrado de materia orgánica (MO) es considerado alto (4,9%), dentro del rango entre 2 – 5 % de MO, definido para suelos agrícolas (Fassbender, 1987). De esta manera el elevado contenido de materia orgánica, contribuiría en la productividad de este suelo debido a que constituiría una fuente importante de nutrientes, además mejoraría su estructura, y favorecería la absorción y retención de calor (actuando como regulador de temperatura del suelo) y ejerciendo un efecto estabilizador ante posibles cambios de pH (efecto tampón) .

En cuanto a los valores de pH registrados, en agua y en CaCl_2 , estos corresponden a valores neutros, donde en el primer caso se mide la concentración de H^+ libres en la disolución suelo, correspondiente a la acidez activa y en el segundo, el pH medido en CaCl_2 es levemente menor con respecto al agua, debido en este caso al intercambio de dos iones hidrogeno que se encuentran adsorbidos a los coloides del suelo, por cada Ca^{+2} , correspondiente a la acidez extraíble, tal como se muestra en la siguiente reacción.

Por lo tanto esta liberación de iones hidrógeno acidifica la disolución con una mayor concentración de iones hidrogeno en la solución suelo.



El elevado contenido de MO, y el pH neutro registrado, constituyen un rol fundamental en la dinámica del plaguicida en el suelo. Estudios recientes (CCHEN, 2004), complementan los anteriores parámetros fisicoquímicos del suelo en estudio (Tabla 6).

Tabla 6: Parámetros físico-químicos complementarios del suelo Serie O'Higgins (CCHEN, 2004).

Parámetros	Suelo Serie O'Higgins
Arcilla (%)	27,41
Limo (%)	35,12
Arena (%)	37,47
Densidad Aparente (g cm^{-3})	1,71
CIC ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$) a pH 7,0	18,6

Considerando los porcentajes presentados para las tres fracciones de partículas (Tabla 6), la textura del suelo Serie O'Higgins, de acuerdo al triángulo textural (USDA) correspondería a un suelo Franco- Arcilloso, el cual debido a la gran superficie específica presentada por la fracción arcillosa, favorecería la retención de agua y plaguicidas en el suelo. Presenta además, alta densidad aparente (considerando que estas muestras de suelo corresponden a los primeros 10 cm de profundidad donde se esperaría menor compactación, densidad y mayor porosidad), la cual dificultaría el intercambio de aire, movimiento de agua y plaguicidas (que se distribuyen en el suelo disueltos en agua). También presenta una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC), factor que también favorecería la adsorción y retención de plaguicidas (cargados positivamente) por parte de los coloides arcillosos y orgánicos del suelo.

4.2 Determinación de la vida media del insecticida Clorpirifos

La determinación de la vida media del insecticida Clorpirifos, se realizó a través de la cuantificación de $^{14}\text{CO}_2$ resultante de la combustión de las muestras de suelo, por medio de la actividad presentada por cada muestra radiactiva expresada en desintegraciones por minuto (dpm), con la ayuda de un contador de centelleo líquido (CCL), (Beckman LS 5000 TD).

Para informar la cantidad real de dpm que contiene cada muestra, fue necesario corregir los valores de cpm, registrados inicialmente por el equipo contador de centelleo, a través de la eficiencia de conteo (ef) del instrumento.

4.2.1 Determinación de la eficiencia de conteo

La determinación de la eficiencia de conteo del equipo se efectuó agregando cantidades crecientes de interferente químico (CCl_4), a muestras que contienen líquido centellador y el radioisótopo a medir. Con ello el instrumento calcula un factor de corrección, denominado Hf, para cantidades de interferente específico en una muestra y asigna un % de eficiencia de conteo a cada medición.

Tal comportamiento es descrito a través de la curva de Quenching Químico presentada a continuación, (Figura 17), donde la eficiencia de conteo del equipo disminuyó linealmente con el aumento de la interferencia.

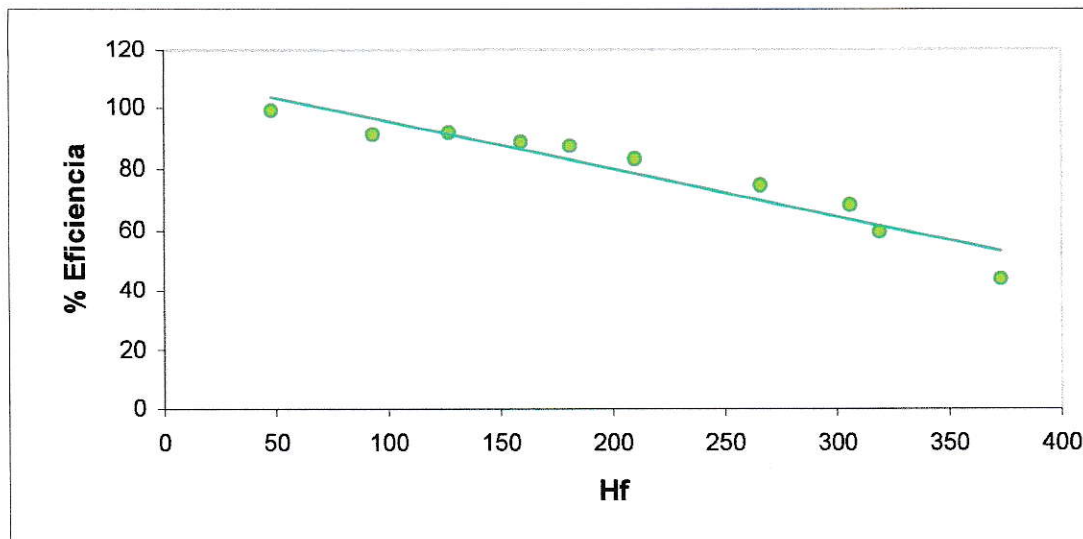


Figura 17: Curva de Quenching Químico.

Con este ajuste, que presenta una aceptable correlación entre las mediciones ($r > 0,95$), es posible interpolar eficiencias de conteo (%), de acuerdo a las interferencias que presenta cada muestra en el presente experimento, permitiendo así obtener resultados experimentales independientes de grado de interferencia química, llamada también “extinción o inhibición química”.

Por lo tanto al contar con la eficiencia de conteo y los cpm registrados inicialmente en cada medición, el equipo, entrega la cantidad real de dpm, despejando la relación (3).

$$\%ef = \frac{cpm \times 100}{dpm} \quad (3)$$

4.2.2 Disipación del insecticida Clorpirifos

Los resultados obtenidos en la determinación del % de disipación de Clorpirifos, para ambos suelos con contenidos de humedad de 50 % y 75 % de la Capacidad de Campo (CC) respectivamente, en función del tiempo, se presentan en la siguiente figura (Figura 18).

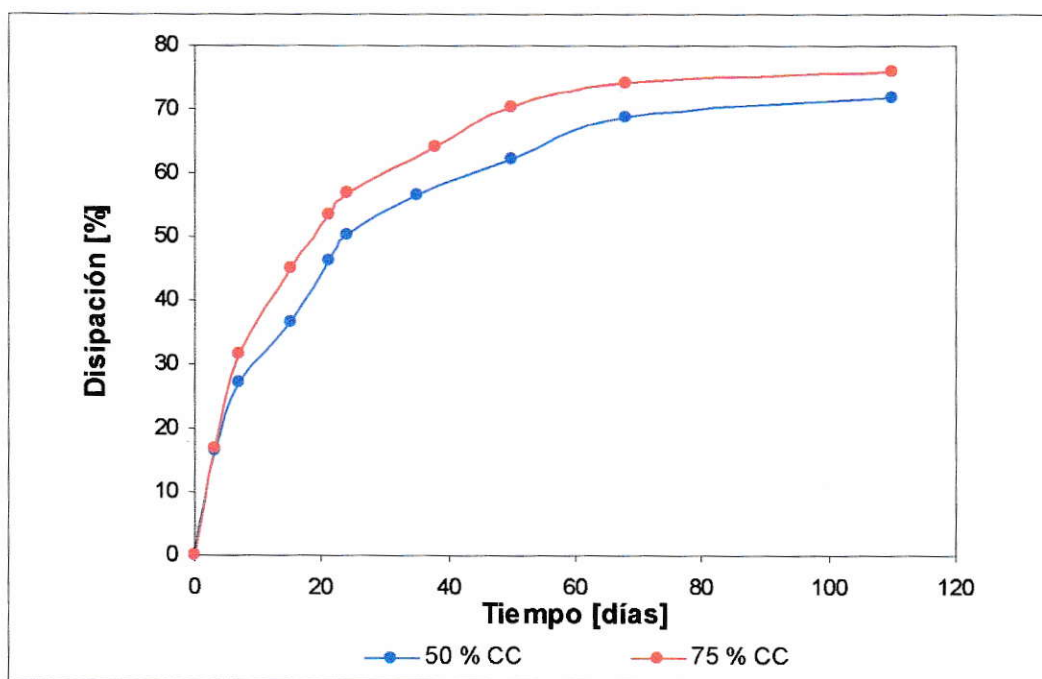


Figura 18: Disipación de Clorpirifos en el suelo con contenidos de humedad de 50 y 75 % de la CC.

Se observa en la figura la evolución de la disipación de Clorpirifos en el tiempo, lo cual se refleja en la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ recuperado en el suelo correspondiente a cada tratamiento de humedad, considerando para ello como 100% al porcentaje recuperado por combustión en el tiempo cero.

Los porcentajes de disipación para ambos contenidos de humedad en el suelo, se mantienen en similares valores dentro de los primeros 7 días del ensayo. Luego de este periodo el tratamiento correspondiente al suelo a 75 % de la CC marca una diferencia significativa al elevarse el porcentaje de disipación del insecticida en un 10% aproximadamente en cada muestreo y distanciarse por sobre el tratamiento correspondiente al 50 % de la CC, durante el transcurso del ensayo.

Es importante señalar que en cuanto a la precisión de los datos experimentales obtenidos a través de este método, que mide el error aleatorio del análisis, los valores de dpm registrados para ambas curvas presentan coeficientes de variación (CV) inferiores a 10%. De esta manera se obtuvieron $CV < 5\%$ y $CV < 8\%$ para los tratamientos de humedad de 50 y 75% de la CC respectivamente. Estos resultados demuestran la validez de los datos experimentales (método se valida para ambos tratamientos de humedad), dan cuenta del grado de concordancia mutua entre ellos y demuestran por lo tanto la reproducibilidad del método.

De manera análoga, los valores de DPM obtenidos a través del análisis por CCL, fueron convertidos a ng de Clorpirifos residual y expresados como $ng\ g^{-1}$ de suelo tal como se muestra en la siguiente figura (Figura 19), a partir de la concentración inicial de $113\ ng\ g^{-1}$ determinada en el primer muestreo (considerando este valor como 100% de Clorpirifos presente en el suelo) y, correspondiente a la concentración del plaguicida en el tiempo cero (Anexo V).

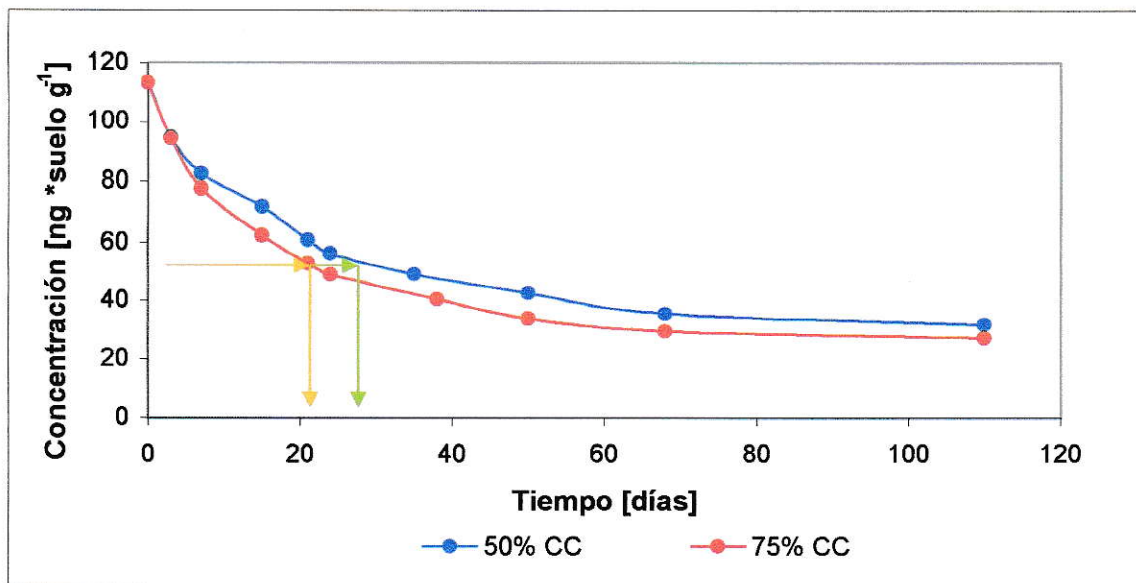


Figura 19: Clorpirifos residual en el suelo con contenidos de humedad de 50 y 75 % de la CC.

Como se observa en la figura las tendencias para ambos ensayos muestran un comportamiento similar, sin embargo, si se consideran los tiempos de vida media interceptando las curvas al 50% de disipación (→ para 75% de la CC y → para 50% de la CC) es posible inferir que existe una diferencia temporal de 7 días entre ellas. Es decir transcurrido el día 21 de ensayo, el tratamiento de 75 % de la CC, alcanza un 53,5% de disipación (encontrándose en el suelo 52,7 ng g⁻¹ de Clorpirifos residual), mientras que para el tratamiento de 50 % de la CC, esto acontece una semana después, el día 28 de ensayo, registrando un 49,7% de disipación con 57,0 ng g⁻¹ de insecticida residual encontrado en el suelo.

Si bien la velocidad de disipación del plaguicida en este estudio es obtenida de manera experimental bajo condiciones de laboratorio controladas, como ya se mencionó, también depende de innumerables factores tanto del suelo como del

plaguicida. Es así como nuestros resultados se encuentran dentro del orden temporal de acuerdo a trabajos informados en bibliografía que indican que la vida media de Clorpirifos en suelos, varía entre 2 a 8 semanas (Awasthi y col, 1997), y entre 12 a 49 semanas (Singh y col, 2003), considerando diferentes condiciones de humedad, pH y contenido de MO (Tabla 7).

Tabla 7: Comparación de tiempos de vidas medias para diferentes condiciones de suelos.

T _{1/2} (días)	pH	MO (%)	Régimen de Humedad (%)	Autor, año
9*	7,1	0,9	Capacidad de campo (CC)	Awasthi y col, 1997
25	6,2	3,1	Sobre la CC, sumergido	Awasthi y col, 1997
224**	4,7	2,3	50% de la CC	Singh y col, 2003
18**	8,4	3,1	50% de la CC	Singh y col, 2003
21*	7,2	4,9	75% de la CC	Presente estudio, 2005
28	7,2	4,9	50% de la CC	Presente estudio, 2005

De la tabla es posible observar la importancia de las características que presenta el suelo en la determinación de la vida media del plaguicida, en especial de la MO, donde debido a su alta capacidad de adsorber y retener plaguicidas, se observan T_{1/2} inferiores mientras menor es el porcentaje de MO del suelo, en condiciones de similar pH y humedad (*). El pH también es un factor relevante; es así como suelos (**) con diferente pH y con iguales condiciones de humedad y similar contenido de MO, presentan T_{1/2} muy discrepantes. Las condiciones alcalinas del suelo aceleran los T_{1/2}, debido a que bajo estas condiciones el plaguicida es más susceptible a la degradación química a través de la hidrólisis.

Con respecto a las curvas mostradas en la figura 19, ambas indican una disipación de Clorpirifos en dos fases. La primera corresponde a una disipación rápida ocurrida entre el día 0 y el día 35, y luego se muestra una segunda fase de disipación lenta que se extiende desde el día 35 al día 110 correspondiente a la fecha final del ensayo (ultimo muestreo). El estudio realizado por Baskaran y col en 1999, coincide con el comportamiento observado para Clorpirifos mostrado en la figura 19 y apuntan que la disipación del insecticida ocurre de manera bifásica, es decir con una fase inicial de rápido decrecimiento y corta duración y otra fase de lenta desaparición y extensa duración.

Esto coincide también con lo establecido en literatura acerca del comportamiento de los plaguicidas (Figura 20), en la cual se describe cómo su desaparición del suelo transcurre de acuerdo con la ley cinética de primer orden, donde se delimitan tres fases (Navarro y col, 1992).

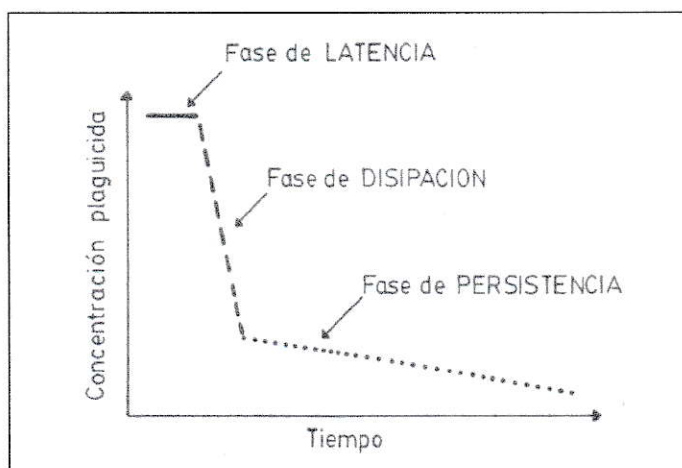


Figura 20: Cinética de degradación de los plaguicidas en el suelo (Navarro y col, 1992).

En la figura 19 no es posible observar la fase de latencia, imperceptible de acuerdo a los intervalos de tiempo de muestreo establecidos en el presente estudio, aunque su presencia se podría inferir desde el experimento ya que la concentración inicialmente registrada de 113 ng g^{-1} en el primer muestreo, disminuye con respecto a la concentración registrada de 94 ng g^{-1} en el segundo muestreo. Tal disminución de la concentración da cuenta del paso de la primera fase a la siguiente, con un decrecimiento de aproximadamente un 16% de su concentración registrado en el segundo muestreo, 72 h después del primer muestreo.

Es necesario señalar que dentro de los factores responsables de la disminución de la concentración, la manipulación de las muestras de suelo, en la etapa de combustión principalmente, no sería relevante, debido a que el valor presentado por la medición en el tiempo cero, discrepó solamente en 1,98% con respecto al valor presentado por el blanco en la misma medición. Por otro lado, entre los procesos experimentados por el plaguicida en el suelo, la volatilización no contribuiría mayormente a esta disipación debido a la baja presión de vapor del Clorpirifos ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mm Hg.}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) y tampoco se debería a procesos de lixiviación, erosión, difusión, fotodescomposición debido a las condiciones herméticas de incubación de las muestras de suelo.

Posteriormente, se presenta la segunda fase denominada "disipación". En ella la concentración de Clorpirifos decrece rápidamente en los primeros 35 días de ensayo, con porcentajes que alcanzan entre un 56 y 64 % de disipación para los suelos con regimenes de humedad a 50 y 75% de la CC respectivamente. Redondo y col, en 1997, han informado que en suelos con menor contenido de MO y mayor pH, el mismo porcentaje de disipación se registra en los primeros 15 a 20 días de ensayo.

Es en este periodo donde ocurre la mayor disminución en la concentración de Clorpirifos y donde se registró el parámetro evaluado en el presente estudio, la vida media del insecticida Clorpirifos ($T_{1/2}$), de 3 y 4 semanas para los ensayos con tratamientos de humedad de 75 y 50 % de CC respectivamente (a 20°C). De acuerdo a nuestros resultados el proceso de disipación del 50% de Clorpirifos desde el suelo, parece llevarse a cabo en tiempos relativamente cortos (3-4 semanas), con tiempos de vida media que se encuentran dentro del rango informado por la ficha técnica del fabricante de 4-10 semanas (BASF, 2004).

A partir del día 35 de ensayo es posible observar la fase final de la disipación del plaguicida, denominada "persistencia", de larga duración y donde se observa que la cantidad de Clorpirifos residual en ambos tratamientos de humedad, tiende a estabilizarse en el tiempo (últimos muestreos), variando entre 1-3 % entre cada muestreo, hasta el último de ellos efectuado el día 110. Baskaran y col, 1999 han evaluado que luego de similar periodo de ensayo, el Clorpirifos alcanza entre 85-95% de disipación, en suelos con menor contenido de MO y arcillas, evidentemente bajo distintas condiciones experimentales.

Finalmente el Clorpirifos al dar termino al ensayo, alcanza un 71% (Tratamiento de 50% CC) y 76 % (Tratamiento de 75% CC) de disipación, lo cual corresponde a 31,9 y 27,1 ng de insecticida remanente por gramo de suelo respectivamente. Los resultados de este trabajo refuerzan la noción de que la humedad del suelo junto a diversos procesos físicos, químicos y microbiológicos, (discutidos más adelante y todos ellos relacionados entre sí), serían responsables de la dinámica y disipación de Clorpirifos en el suelo.

Diversos estudios (Racke y col, 1990; Sánchez-Martín y Sánchez-Camazano, 1991; Awasthi y col, 1996; Baskaran y col, 1999) han indicado que los factores medioambientales y en general las condiciones específicas de cada experiencia influyen considerablemente en el desarrollo de tales procesos, siendo los más importantes la humedad, el pH, la actividad microbiana, el contenido de arcillas y materia orgánica del suelo, además de las propiedades intrínsecas (físicoquímicas y estructura) de cada plaguicida.

Tanto factores bióticos como factores abióticos son considerados como importantes rutas de degradación y/o disipación de Clorpirifos en el suelo. Clorpirifos pertenece al grupo de plaguicidas organofosforados, los cuales son muy susceptibles a la hidrólisis, por lo tanto dentro de los factores abióticos, ésta constituiría el principal factor responsable de la desaparición del plaguicida. Esta hidrólisis implica la ruptura de tres enlaces éster (P-O-C) de ésta molécula, dos enlaces éster alquil terciario y un enlace éster fosfato, dando lugar a un nuevo enlace con el átomo de oxígeno de la molécula de agua.

Indudablemente la velocidad de la hidrólisis de Clorpirifos se ve afectada y acrecentada por el contenido de humedad que contenga el suelo (Awasthi y col, 1996), afirmación ratificada por el presente estudio donde el suelo con contenido de humedad de 75 % de la CC muestra un tiempo de vida media de 3 semanas, representando una rápida degradación y por consiguiente desaparición, en comparación a lo presentado por el suelo con menor contenido de humedad a 50% de la CC con un tiempo de vida media de 4 semanas.

En estudios recientes Singh y col, 2003 demostraron que el proceso de hidrólisis está estrechamente relacionado con el pH del suelo. Confirmando lo establecido por Racke y col en 1990 y más tarde por Baskaran y col en 1999, mostraron que la reacción de hidrólisis ocurre con poca frecuencia en suelos ácidos, induciendo entonces una lenta degradación del insecticida bajo estas condiciones, mientras que en los suelos con pH evaluados entre 7,1 - 8,5 la reacción procede con mayor rapidez, acelerándose mientras mayor sea el pH del suelo. Ejemplo de ello es un estudio realizado por el mismo autor en suelos del Reino Unido, donde la vida media del Clorpirifos disminuyó de 256 a 35 días con un aumento de pH de 4,7 a 6,7.

En este caso, el pH registrado para el suelo en estudio, de 7,2, conduciría a una hidrólisis de tipo neutra (Racke, 1993), distinguiéndose dos posibles rutas. En una de ellas, el ión hidróxido de la molécula de agua en un ataque nucleofílico (reacción de tipo SN_2) rompe el enlace éster alquil terciario del carbono del grupo Etoxi de la molécula de Clorpirifos dando origen a dos metabolitos: Etanol y Desetil Clorpirifos (0-etil 0- (3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato). Posteriormente y debido a un segundo ataque nucleofílico de otro ión hidróxido al enlace éster fosfato, se formaría el principal metabolito del Clorpirifos producto de esta hidrólisis neutra, el TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol). En una segunda ruta se produce el ataque nucleofílico directo del ión

hidróxido del agua al enlace éster fosfato, produciéndose inmediatamente TCP. Sin embargo la ruta de degradación mas probable de Clorpirifos, correspondería a esta última debido a que el enlace éster fosfato es más débil y por lo tanto mas susceptible al ataque nucleofílico que el enlace éster alquil terciario (Figura 21).

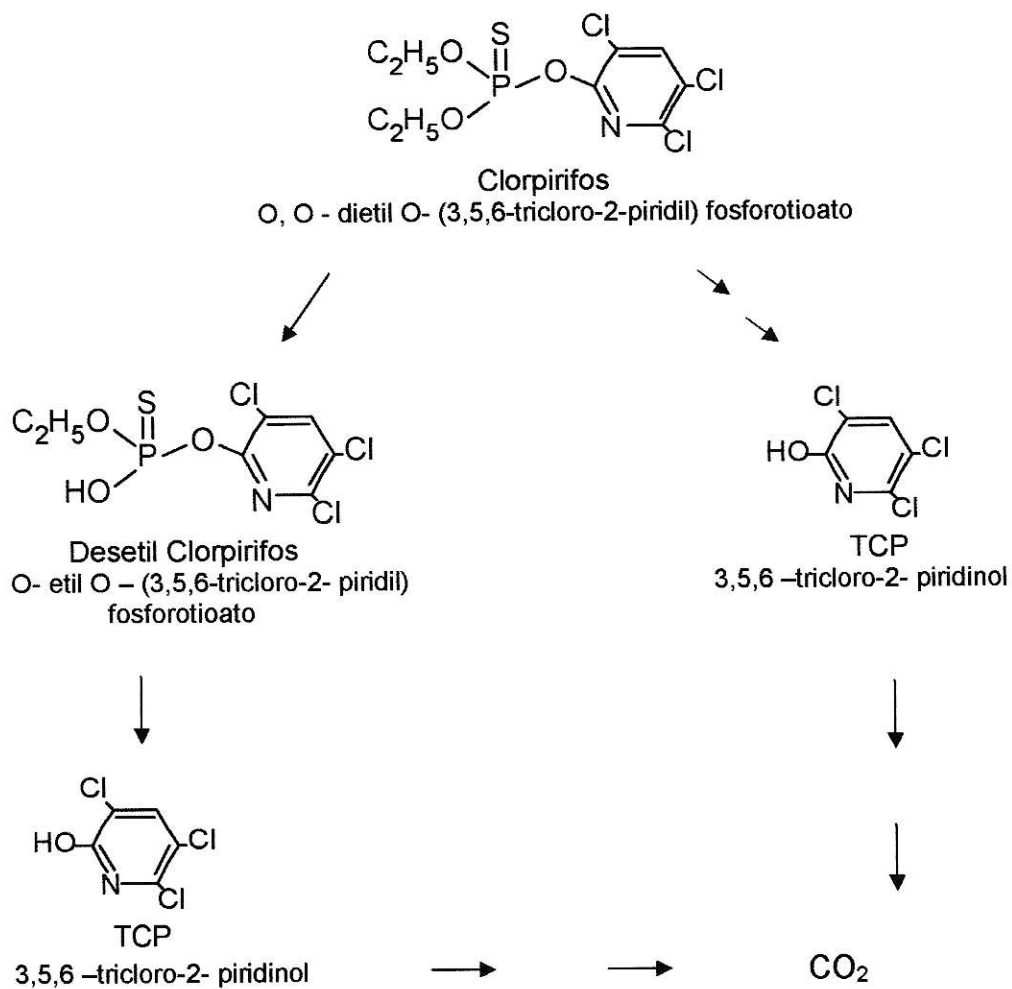


Figura 21: Hidrólisis neutra de Clorpirifos.

Sin embargo, a pesar de que la degradación del insecticida, se encuentra acelerada por condiciones del suelo de alto contenido de humedad y alcalinidad, coexisten otros procesos paralelos que retardarían la degradación inhibiendo por otro lado la reacción de hidrólisis. Como es el caso de los procesos de adsorción, donde dependiendo de la estructura del plaguicida organofosforado, se definen dos situaciones.

La primera situación se presenta en plaguicidas con enlaces P=S (tiofosfatos), presentes en la molécula de Clorpirifos. Sánchez-Martín y Sánchez-Camazano, en 1991, estudiaron la relación entre la estructura del plaguicida organofosforado y la adsorción por parte de los componentes del suelo, concluyendo que los organofosforados con este tipo de enlaces son adsorbidos fuertemente por la materia orgánica que contiene el suelo. Esta adsorción es especialmente gobernada y controlada por los Ácidos fúlvicos (componente humico mayoritario) a través de residuos ligados y tiene lugar preferentemente en plaguicidas apolares (hidrofóbicos), no iónicos y sin carga, como es el caso de Clorpirifos y otros plaguicidas como Paratión, Fentión y Tricloronat (Navarro y col, 1992).

De manera contraria cuando la estructura del plaguicida Organofosforado presenta enlaces de tipo P=O (fosfato), como es el caso del Clorpirifosoxón, Paraoxón o Metamidofos, la adsorción estaría relacionada con el contenido de arcillas presente en el suelo. Los mismos autores en investigaciones realizadas en 1983, indican que en esta situación, debido al carácter electronegativo del átomo de oxígeno (3.5 Pauling, superior a la electronegatividad del azufre de 2.5 Pauling), éste aumenta la naturaleza electrofílica del átomo fósforo, y consecuentemente el plaguicida es más propenso al ataque nucleofílico del ión hidróxido, favoreciendo en este caso particular la reacción de hidrólisis en lugar de inhibirla.

El proceso de adsorción experimentado por Clorpirifos sobre el suelo estudiado debido al enlace P=S en su molécula, estaría asociado al elevado contenido de materia orgánica presente en el suelo (4,9%, de entre 2-5% definido para suelos agrícolas), y el contenido de arcillas (27,4%) con respecto al resto de los componentes minerales del suelo (limo y arena), los cuales concuerdan con los resultados obtenidos por Sánchez-Martín y Sánchez-Camazano, en 1991. Atribuyendo por lo tanto, la adsorción de Clorpirifos en este suelo al alto contenido de MO presente. En cuanto al tipo de arcillas presentes en el suelo Serie O'Higgins, son en su mayoría Vermiculitas expandibles (CIREN, 2002), quienes presentan gran área superficial y capacidad de cambio con respecto a otro tipo de arcillas presentes como Esmectitas y Caolinitas. Debido a esto, el suelo presenta gran capacidad de adsorción, y por lo tanto sería la Vermiculita la responsable del proceso de adsorción del Clorpirifos a través de arcillas en este suelo, complementando la adsorción a través de la MO.

Asimismo, a pesar de la significativa importancia de la composición de la fracción mineral y orgánica del suelo en los procesos de degradación y consecuente desaparición del plaguicida, las propiedades intrínsecas del insecticida Clorpirifos son igualmente responsables. En este sentido el alto valor del coeficiente de adsorción, K_{oc} de 8498 mL g⁻¹, ratificaría el hecho que las moléculas del Clorpirifos se fijan fuertemente al suelo, inmovilizando el insecticida rápidamente, e inhibiendo por lo tanto la reacción de hidrólisis. Adicionalmente, este carácter inmóvil se correlaciona con el moderadamente alto coeficiente de partición Octanol/agua (K_{ow}) del Clorpirifos, de 50.000 (en comparación al K_{ow} presentado por el DDT, plaguicida altamente persistente, de 80.000), que confirma la elevada tendencia de Clorpirifos a asociarse fuertemente con las fases apolares del suelo (Racke, 1993). Consecuentemente se

sugiere que el retardo e inhibición de los procesos de hidrólisis (principal ruta de degradación de Clorpirifos) serían consistentes con los procesos de adsorción sufridos por el plaguicida.

Luego de la hidrólisis, dentro de los principales procesos abióticos de disipación, como la remoción física (que origina la translocación del plaguicida a otro compartimento ambiental), la volatilización no constituiría una ruta importante en el presente estudio, dada la baja presión de vapor del Clorpirifos ($2,0 \times 10^{-5}$ mm Hg, a 25 °C), sin embargo Racke en 1993 y posteriormente Awasthi y col en 1996, determinaron que en ausencia de materia orgánica, la presión de vapor de Clorpirifos, aunque moderada, puede determinar que la volatilización sea un mecanismo de remoción importante para este compuesto.

De la misma forma Kogan y Pérez (2003), observaron que la radiación solar y las intensas temperaturas activarían los procesos de volatilización y por lo tanto la velocidad de degradación del insecticida. Sin embargo las condiciones particulares de incubación del suelo en este estudio (a temperatura controlada de 20 °C y a oscuridad completa) impedirían afirmar que lo anterior pudiera producirse en este caso. Esta situación sumada a la naturaleza apolar, y a la baja solubilidad del insecticida en agua ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$ a 25 °C) dan cuenta del bajo potencial que presentaría el Clorpirifos de migrar a través del perfil del suelo (lixiviación).

Complementando los parámetros anteriores, con el antecedente del valor de Koc y los tiempos de vida media obtenidos, es posible calcular el índice de GUS (Kogan y Pérez, 2003), parámetro que indica la potencialidad del Clorpirifos de lixiviar y contaminar acuíferos. Cuando GUS >2,8 el plaguicida es potencialmente lixiviable y cuando GUS <1,8 el plaguicida es no lixiviable. El índice de GUS se calcula de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{GUS} = \log_{10} (T_{1/2}) [4 - \log_{10} (\text{Koc})] \quad (4)$$

De esta manera al aplicar (4), se obtuvieron índices de GUS entre 0,09 y 0,1 (para 50 y 75% de la CC respectivamente), valores muy inferiores a 1,8 que indican que Clorpirifos es un plaguicida no lixiviable, descartando este proceso abiótico como responsable de la disipación del plaguicida.

Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos (RAM)

Para estudiar la influencia de la acción microbiana en la degradación de Clorpirifos, y por lo tanto en la vida media del insecticida, se realizó un recuento de microorganismos aeróbios mesófilos (RAM), al comienzo del ensayo (To), luego al alcanzar el 50 % de disipación del insecticida para cada tratamiento de humedad ($T_{1/2}$) y finalmente al término del ensayo (Tf). Los resultados de este recuento se muestran en la figura 22.

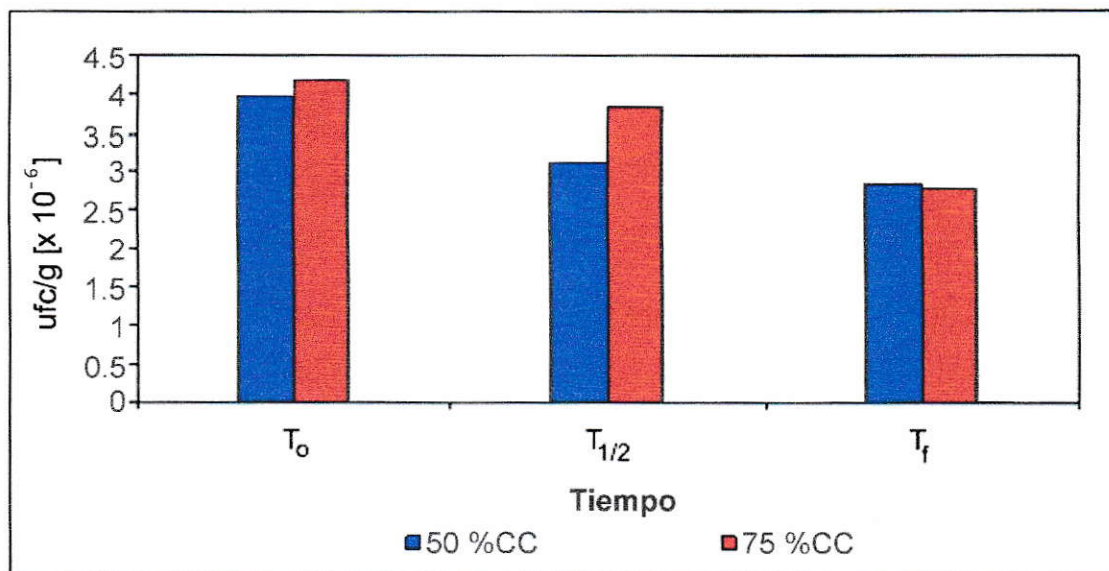


Figura 22: Recuento microorganismos aeróbios mesófilos.

En la figura 22, es posible apreciar la diferencia en la cantidad de microorganismos existentes en T_0 para ambos tratamientos de humedad, expresados en ufc g^{-1} (unidades formadoras de colonias por gramo de suelo). La magnitud de tales diferencias con respecto al suelo seco (que se determinó de $3,49 \times 10^6 \text{ ufc g}^{-1}$, al comenzar el ensayo) se estima son del orden de 500.000 a los 710.000 ufc g^{-1} para el suelo a 50% y 75% de la CC respectivamente. Este comportamiento, coincide y es comparable con lo informado por Awasthi y col en 1996, quienes describen que pequeñas diferencias en los contenidos de humedad para un mismo suelo fomentan y favorecen el desarrollo de la actividad microbiana en ellos.

En $T_{1/2}$, muestreo realizado una vez alcanzado el 50% de disipación de Clorpirifos en ambos tratamientos, se observa una disminución en la población microbiana para ambos tratamientos de humedad, siendo más abrupta la disminución en el tratamiento a 50% de la CC con un 22%, mientras que el tratamiento a 75% de la CC registra una disminución de un 8% con respecto T_0 . No obstante lo anterior se observa que la tendencia se mantiene con respecto a T_0 , donde la cantidad de microorganismos presentes es superior cuanto mayor es el contenido de humedad en el suelo. La mayor cantidad de microorganismos existentes en el tratamiento a 75% de la CC ($T_{1/2}$), fortalecería los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual el TD_{50} de Clorpirifos se alcanzó con mayor rapidez en el suelo con este contenido de humedad, probablemente por la contribución realizada por la acción microbiana (o biodegradación), al proceso de disipación del plaguicida, sumada a los procesos abióticos anteriormente discutidos.

Tal disminución en la población microbiana para ambos tratamientos de humedad y acentuada en el suelo con menor contenido de humedad, aparte de estar estrechamente relacionada con dicho factor, también es agravada por las condiciones de incubación del ensayo, las cuales no favorecerían dicho crecimiento poblacional. Por lo tanto, considerando que la actividad microbiana para microorganismos aeróbios mesófilos se desarrolla de manera óptima, en temperaturas que bordean los 40°C y que requieren de luz para completar su proceso metabólico, es predecible que las condiciones de incubación del suelo a la temperatura controlada de 20°C y a oscuridad completa no colaboren en dicha sobrevivencia, ni proliferación de microorganismos a lo largo de todo el ensayo, siendo este factor más importante en la medida que transcurre el tiempo de ensayo.

En Tf se observa una considerable disminución de los microorganismos presentes en el suelo, esta vez en el tratamiento a 75% de la CC, con un decrecimiento de un 25% con respecto a la población microbiana registrada en $T_{1/2}$, (en comparación al leve descenso de los microorganismos presentes en el suelo a 50% de la CC), atribuible según investigaciones previas a la producción de TCP, metabolito primario resultante del proceso de hidrólisis de Clorpirifos (Lalah y col, 2003). Racke y col en 1990, informaron que el Clorpirifos presenta algún grado de resistencia a la degradación microbiana atribuible a los posibles efectos tóxicos desarrollados por el TCP, resultados corroborados posteriormente por Singh y col en 2003. Debido a que el proceso de hidrólisis ocurre con mayor rapidez en suelos con mayor contenido de humedad, es razonable esperar que en el suelo a 75% de la CC se encontrara más TCP y por lo tanto, el efecto tóxico se vería aumentado, causando la posterior y considerable disminución de la comunidad microbiana existente en dicho suelo.

En cuanto a la acción microbiana degradativa propiamente tal ocurrida distintamente en ambos contenidos de humedad, la habilidad única de los microorganismos presentes en el suelo, para mineralizar completamente compuestos orgánicos alifáticos, aromáticos y heterocíclicos, les permitiría la división y mineralización del anillo heterocíclico de la molécula de Clorpirifos a CO_2 , utilizando al plaguicida como fuente de carbono y nitrógeno, en el proceso conocido como catabolismo (Racke y col, 1990, Awasthi y col, 1996, Singh y col, 2003). Sin embargo lo anterior no queda completamente comprobado en este estudio ya que solo se estudió el efecto de la humedad en la población microbiana, y no directamente qué sucede con dicha población en ausencia de Clorpirifos. Por consiguiente, de acuerdo a los resultados expuestos en esta sección, la biodegradación, acelerada por

condiciones de mayor humedad, cumpliría un rol fundamental de apoyo a la degradación y disipación del Clorpirifos en el suelo.

4.2.3 Cinética de degradación

Para interpretar la disipación de Clorpirifos, los modelos de regresión son ampliamente utilizados (Awasthi y col, 1996, Kogan y Pérez, 2003).

De esta manera para cuantificar la velocidad de degradación del plaguicida y con ello el $T_{1/2}$ (ó vida media) de Clorpirifos, se proponen cinéticas de degradación que consisten en establecer una relación de dependencia de la velocidad de degradación con la concentración de plaguicida existente en un determinado tiempo.

En el presente estudio, para calcular la constante de velocidad de degradación fue utilizada la regresión exponencial de primer orden $C = C_0 e^{-kt}$ (1), graficando la concentración de Clorpirifos C versus el tiempo (Figura 23), utilizando para ello los valores de concentración y tiempo correspondientes a la fracción lineal de la figura 19.

De esta representación gráfica, al obtener la constante de degradación k (tasa de degradación), correspondiente a la pendiente de la curva, es posible calcular el tiempo de vida media, en función de k , de acuerdo a la ecuación: $T_{1/2} = \ln 2/k$ (2).

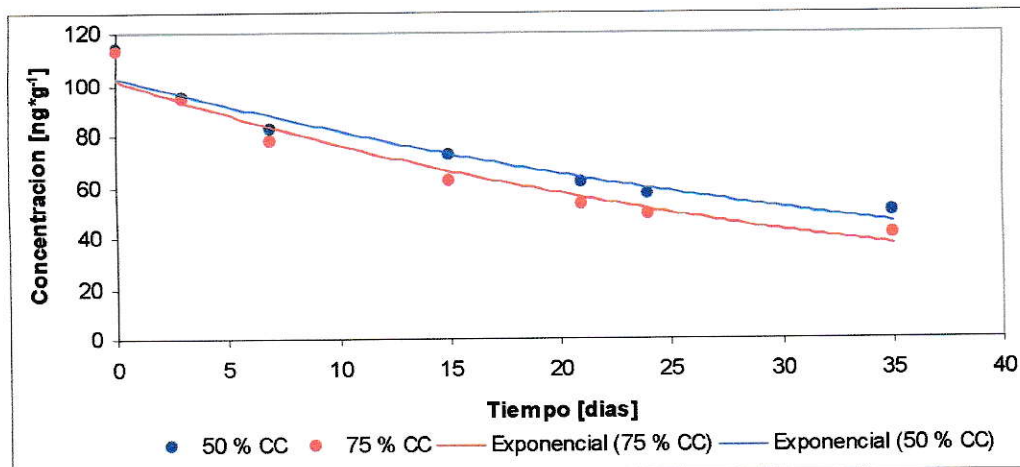


Figura 23: Tasa de degradación Clorpirifos.

Los resultados obtenidos de la regresión exponencial de primer orden (tabla 8), muestran que los datos obtenidos experimentalmente a través de las técnicas isotópicas empleadas se ajustan muy bien a este modelo, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,96 en ambos regímenes de humedad.

Tabla 8: Constantes de degradación y vida media de Clorpirifos.

Régimen de Humedad del suelo	Constante de degradación K (día ⁻¹)	r^2	$T_{1/2}$ Teórico (días)	$T_{1/2}$ Experimental (días)
50 % de la CC	-0,0232	0,961	30	28
75 % de la CC	-0,0289	0,958	24	21

En tanto, los tiempos de vida media derivados del modelo de 24 y 30 días para los tratamientos de humedad de 75 y 50 % de la CC respectivamente, confirman los resultados obtenidos en este estudio a través de la disipación de la mitad de la concentración inicialmente aplicada de Clorpirifos en cada suelo, expresado en $^{14}\text{CO}_2$ remanente. Los tiempos de vida media revelados por el modelo sólo se diferencian en 3 y 2 días con respecto a los definidos bajo condiciones experimentales en este estudio para los tratamientos de 75% y 50% de la CC respectivamente.

La pequeña diferencia entre los $T_{1/2}$ derivados del modelo cinético y los derivados del trabajo experimental en laboratorio, destaca la relevancia de dichos modelos matemáticos como un importante apoyo, corroborando la veracidad de los resultados obtenidos de manera experimental.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó la vida media del insecticida Clorpirifos en un suelo agrícola de la VI Región bajo dos regimenes de humedad del suelo, utilizando para la detección y cuantificación del plaguicida técnicas isotópicas. Con este propósito se determinó la diferencia temporal en las vidas medias registradas para suelos a 50 y 75% de la capacidad de campo (CC), y conjuntamente se analizó cómo, las características intrínsecas del Clorpirifos y las propiedades del suelo Serie O'Higgins influyen en los factores bióticos y abióticos responsables de tal comportamiento. De los resultados obtenidos y su correspondiente discusión, se puede concluir lo siguiente:

1. Respecto a la técnica utilizada en la determinación de la vida media de Clorpirifos, se pudo comprobar las ventajas que tiene la utilización de las técnicas isotópicas, constituyendo una alternativa de detección y cuantificación de plaguicidas en los sistemas ambientales. Las ventajas presentadas por la técnica son las siguientes:
 - a. Alta sensibilidad de detección y cuantificación de (¹⁴C) Clorpirifos, logrando medidas del orden de los ng, perfectamente expresables también en el orden de los pico gramos (pg), considerando un límite de detección de 3,4 ng de Clorpirifos por g de suelo y un limite de cuantificación de 34 ng/g para este estudio.

- b. Baja variabilidad entre las mediciones, con coeficientes de variación, $CV < 10\%$.
 - c. Posibilidad de detección y cuantificación del insecticida marcado sin la necesidad de extraer los analitos desde la matriz.
 - d. Con respecto a estudios realizados en campo, bajo condiciones controladas, también presentaría ventajas al permitir seguir el comportamiento del compuesto en diversas matrices ambientales.
2. Respecto a los tiempos de vida media registrados para los diferentes regimenes de humedad, de 21 y 28 días en suelos a 75 y 50% de la CC respectivamente, se concluye que:
- a. La humedad efectivamente es un factor que acelera la disipación de Clorpirifos en el suelo, debido a la susceptibilidad que presenta el insecticida organofosforado a la hidrólisis, dadas las condiciones del suelo (principalmente el pH) y las características propias del Clorpirifos, por sobre otros procesos de disipación de origen abiótico, como por ejemplo la volatilización.
 - b. La lixiviación tampoco constituiría una vía de disipación en condiciones de campo debido al índice de GUS de 0,09 y 0,1, para humedades de 50 y 75 % de la CC respectivamente, que califica al Clorpirifos como no lixiviable bajo ambos regimenes de humedad.

- c. De acuerdo a factores como un alto coeficiente de adsorción K_{oc} , elevado contenido de MO, la lipofilicidad y el enlace P=S presentado por la molécula de Clorpirifos, se favorecería el proceso de sorción el cual posiblemente de manera paralela inhibiría la hidrólisis, retardando los tiempos de vida media registrados en este estudio.
 - d. En cuanto a la biodegradación como responsable de la disipación de Clorpirifos, es posible concluir que en ambos regimenes de humedad la contribución a la disipación del insecticida esta disminuida, debido a las condiciones de incubación del ensayo, y dada la baja adaptación de los microorganismos, se observó una disminución de la actividad microbiana en ambos suelos.
3. Con respecto a la cinética de degradación utilizada para ratificar los resultados de tiempos de vida media determinados a través del % de disipación de $^{14}\text{CO}_2$, es posible concluir que los datos se ajustan con $r^2 > 0,96$, derivando tiempos de vida media que solo se diferencian en 2-3 días para los tratamientos de humedad de 50 y 75% de la CC respectivamente, en comparación a los TD_{50} obtenidos experimentalmente, representando un importante apoyo a este tipo de investigaciones.
 4. Con respecto al régimen de humedad más recomendable bajo las condiciones de utilización de suelo específicas, se concluye que de acuerdo al tiempo de carencia (20 días) definido por el fabricante para la uva de mesa (uso actual del suelo en estudio), el suelo con régimen de humedad de 75% de la capacidad

de campo (CC) con un tiempo de vida media para Clorpirifos de 21 días, es el más recomendable.

En líneas generales se concluye que la estabilidad y comportamiento de Clorpirifos en el suelo está condicionado por una serie de factores interrelacionados de manera que no es posible definir un único parámetro como responsable de su vida media, ni de su destino final en el medio ambiente, lo que justifica continuar con estos estudios.

Finalmente se desprende del presente estudio que conocer la vida media y el comportamiento de Clorpirifos bajo diferentes regimenes de humedad, es de suma importancia debido a que permite anticipar y por consiguiente minimizar impactos ambientales dentro y fuera del punto de aplicación del plaguicida, principalmente minimizando la persistencia ambiental de residuos tóxicos en los suelos y la contaminación de recursos hídricos (evitando la pérdida del curso de agua como recurso utilizable) con la consecuente degradación de la flora y fauna, ya que la persistencia favorece la incorporación del plaguicida a las cadenas tróficas, la acumulación en los tejidos grasos humanos y animales y finalmente la biomagnificación.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- AFIPA. 1999. Manual Fitosanitario. Pp 144-145.
- ATSDR, 1997. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Reseña Toxicológica de Clorpirifos, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Servicio de Salud Pública. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.
- Awasthi, M., y Prakash N., 1997. Persistence of Chlorpyrifos in soils under different Moisture regimes. Pesticide Science. Rev.50: 1-4.
- BASF Chile S.A., 2004. Hoja de datos de seguridad de plaguicidas. http://www.basf.cl/agro/info/pdf_seguridad.
- Baskaran, S., Kookana, R.S. y Naidu, R. 1999. Degradation of Bifenthrin, Chlorpyrifos and Imidacloprid in soil and bedding materials at termicidal application rates. Pesticide Science. Rev.55: 1222-1228.
- CEPIS/OPS, 2005. Curso de auto instrucción en diagnostico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas causadas por plaguicidas. <http://www.cepis.ops-oms.org>.

- CIREN-CHILE. 2002. Estudio Agrológico de la VI Región. Descripción de suelos, materiales y símbolos. Tomo II. Pp 546.
- Ciudad, C. 1990. Manual de técnicas analíticas oficiales para pesticidas organoclorados y organofosforados, en alimentos, tejidos y muestras ambientales. Área de recursos ambientales/programa de ecología y manejo. Pp 5-45.
- Cornejo, J. 2001. Dinámica de los plaguicidas en ecosistemas terrestres. Mesa Redonda: Problemática ambiental y de salud en el uso de plaguicidas persistentes. Congreso Implementación del Convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes.
- FAO/OIEA. 2001. Agriculture and Biotechnology Laboratory, Manual, Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. Pp 1-10.
- Fassbender, H y Bomemiza, E. 1987. Química de suelo con énfasis en suelos de América Latina. Editorial IICA. Pp 420.
- Hebert, V.R., Hoonhout, C. y Miller, G.C. 2000. Use of stable tracer studies to evaluate pesticide photolysis at elevated temperatures. Agric. Food Chem. Rev. 48. 1916-1921.

- <http://www.anasac.cl/App/Catalogo/Frontend/producto>
- <http://www.cchen.cl/Agricultura>
- <http://docs.pesticideinfo.org>
- <http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfasq/es>
- <http://www.ine.cl/27-prensa/documento/pdf/enfoque11.pdf>
- <http://www.sag.cl/framearea.asp>
- Kogan, M. y Pérez, A. 2003. Herbicidas, Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile. Pp 64-69.
- Lalah, J.O., Ondeiki, D., Wandiga, S.O. y Jumba, I.O. 2003. Dissipation, distribution and uptake of ¹⁴C-Chlorpyrifos in a model tropical seawater/sediment/fish ecosystem. Environmental Contamination and toxicology. Rev. 70: 883-890.
- Normas para la Evaluación y Autorización de plaguicidas. Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero, (SAG). 1999. Resolución N° 3670.

- Morell, I. y Candela, L. 1998. Plaguicidas: Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Univertitat Jaumé.
- Navarrete, P.1995. Contaminación de suelos por productos orgánicos. Plaguicidas. En Contaminación y depuración de suelos. Pp 59-77.
- Navarro, S., García, A., y Barba, A. 1992. Persistencia de los plaguicidas en suelos agrícolas. Universidad de Murcia. Pp 17-80.
- OIEA. 1990. Empleo de técnicas nucleares en estudios de relación suelo-planta, Editado por G. Hardarson. Pp 31-40.
- OIEA/FAO. 1992. Guía de trabajos prácticos. Curso regional de capacitación en el uso de isótopos y técnicas de radiación en estudios de productividad de suelo y plantas. Pp 12-15.
- Olea, N. y Fernández, M.F. 2001. Plaguicidas persistentes. Laboratorio de Investigaciones Médicas, Hospital Clínico de la Universidad de Granada.
- Poblete, V. 1989. En apuntes teóricos curso regional, Uso de técnicas isotópicas en estudios de fertilidad de suelos y fertilizantes. Pp 24-51.

- Racke, K.D., Laskowski, D.A. y Schultz, M.R. 1990. Resistance of Chlorpyrifos to Enhanced Biodegradation in Soil. *Agric. Food Chem. Rev.* 38: 1430-1436.
- Racke, K. 1993. Environmental fate of Chlorpyrifos. *Environmental Contamination and toxicology.* Rev.131: 1-80.
- Racke, K.D., Steele, K.P., Yoder, R N., Dick, W.A. y Avidov, E. 1996. Factors affecting the hydrolytic degradation of Chlorpyrifos in soil. *Agric. Food Chem. Rev.* 44: 1582-1592.
- Redondo, M., Ruiz, M., Font, G., y Boluda, R. 1996. Dissipation and Distribution of Atrazine, Simazine, Chlorpyrifos, and Tetradifon Residues in Citrus Orchard Soil. *Environmental Contamination and toxicology.* Rev. 32: 346-352.
- Sadzawka, A. 2004. Métodos de análisis de suelos. Estación experimental La Platina.http://www.inia.cl/platina/pubbycom/edinia/docs/metodos_an_suelos_v2004.pdf
- Saltzman, S y Yaron, B.1986. Pesticidas in Soil. Pp 149-337.
- Sánchez Martín, M., y Sánchez Camazano, M. 1991. Relationship between the structure of organophosphorus pesticides and adsorption by soil components. *Soil Science.* Rev. 152: 283-288.

- Singh, B.K., Walter, A., Morgan, A.J., y Wright, D.J. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. Rev.69: 5198-5201.
- Skoog, D y Leary, J. 1991. *Análisis Instrumental*, Editorial Mc Graw Hill, cuarta edición. Pp 785-789.
- Steubing, L., Godoy, R. y Alberdi, M. 2001. *Métodos de ecología vegetal*. Editorial Universitaria. Pp 106-124.

ANEXOS

ANEXO I

CLASIFICACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS DE USO AGRÍCOLA (AFIPA ,1999).

LD 50 aguda en ratas (mg*kg ⁻¹ de peso vivo)				
	Oral		Dermal	
Categoría	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
I Extremadamente Tóxico	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
II Altamente Tóxico	Más de 5 hasta 50	Más de 20 hasta 200	Más de 10 hasta 100	Más de 40 hasta 400
III Moderadamente Tóxico	Más de 50 hasta 500	Más de 200 hasta 2.000	Más de 100 hasta 1.000	Más de 400 hasta 4.000
IV Ligeramente Tóxico	Más de 500	Más de 2.000	Más de 1.000	Más de 4.000

ANEXO II

REGLAS BÁSICAS DE PROTECCIÓN RADIOLOGÍA PARA TRABAJO EN LABORATORIO (OIEA/FAO, 1992).

1. Utilización y recambio periódico de dosímetro.
2. Por razones de seguridad no es conveniente que personas que trabajan con material radiactivo se encuentren solas en el laboratorio.
3. Se prohíbe la manipulación de personas con heridas abiertas, expuestas.
4. La manipulación y preparación de soluciones con material radiactivo, debe efectuarse en lo posible con dos pares de guantes, esto permitirá desechar el primer par de guantes en caso de contaminarse o romperse.
5. La manipulación de sustancias radiactivas debe ejecutarse dentro de bandejas de seguridad (de p.v.c. u otro material impermeable, no corrosivo) con papel absorbente en su interior y los mesones protegidos con una cubierta plástica.
6. Se prohíbe el pipeteo con la boca. Debe utilizarse cualquier sistema de pipeteo automático.
7. Las precauciones que se deben tomar para manipular recipientes que contienen material radiactivo, dependen de la actividad, energía del radioisótopo, tipo de radiación y tiempo de ejecución del trabajo; según las cuales se determinará la distancia, tipo de manipulación y blindaje para reducir al mínimo las radiaciones.
8. El material que se utiliza para la preparación de soluciones con radioisótopos, debe depositarse en recipientes adecuados para su descontaminación y lavado.

9. Los envases que contengan sustancias radiactivas deben estar claramente identificados con etiquetas, indicando el radioisótopo, actividad y fecha de la actividad inicial o de la dilución.
10. En los laboratorios donde se trabaje con material radiactivo, deben existir recipientes adecuados para depositar los desechos, tanto sólidos como líquidos.
11. Al finalizar el trabajo se debe limpiar la zona de trabajo, lavando con descontaminantes y luego monitoreando el área con detector portátil.

ANEXO III

METODOLOGÍA DE DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CAMPO EN SUELOS (Métodos de ecología vegetal, 2001).

Para el desarrollo de este procedimiento, 100 g de suelo seco al aire son depositados en un cono de papel filtro, previamente masado, sobre un embudo de vidrio dispuesto sobre una probeta.

Luego se adiciona gradual y equitativamente agua destilada con la ayuda de una pisceta, sobre todo el suelo dispuesto en el papel filtro, hasta lograr la saturación completa del suelo. Una vez que el suelo se ha saturado con agua, se deja drenar durante 24-48 h.

Al cabo de este periodo, el suelo húmedo junto al papel filtro son masados. La diferencia entre el peso del suelo seco y húmedo, proporciona la cantidad de agua que es capaz de retener el suelo, que corresponde a la Capacidad de campo del suelo. Los valores se expresan en porcentajes de la siguiente forma:

$$\% \text{ CC} = \frac{[A - (B + C)]}{100}$$

Donde:

- A : masa de suelo húmedo más masa de papel filtro húmedo, (g).
- B : masa de suelo seco al aire, (g).
- C : masa de papel filtro seco, (g).

ANEXO IV

TABLAS DE DATOS EXPERIMENTALES

Tabla 1: Curva de Quenching químico (Datos correspondientes a figura 16).

Factor de corrección Hf	Eficiencia (%)
48	99,3
93	91,3
127	91,8
159	88,8
181	87,4
210	83,2
266	74,7
306	68,4
319	59,5
373	43,8

Tabla 2: Disipación de Clorpirifos en el suelo con contenido de humedad de 50 % de la CC (Datos correspondientes a figura 17).

Tiempo (Días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	Disipación (%)	SD	CV (%)
0	1	3183,22	2979,59	0	145,10	4,87
	2	2970,41				
	3	2919,16				
	4	2845,56				
3	1	2562,32	2489,91	16,43	82,70	3,32
	2	2553,88				
	3	2391,05				
	4	2452,38				
7	1	2090,98	2167,75	27,25	54,82	2,53
	2	2165,88				
	3	2210,93				
	4	2203,19				
15	1	1848,49	1887,68	36,65	42,36	2,24
	2	1901,15				
	3	1859,72				
	4	1941,39				
21	1	1693,79	1599,92	46,3	63,82	3,99
	2	1586,13				
	3	1561,83				
	4	1557,91				

24	1	1533,75	1478,80	50,37	76,98	5,21
	2	1477,58				
	3	1425,08				
35	1	1353,00	1293,96	56,57	71,45	5,52
	2	1355,25				
	3	1213,40				
	4	1254,18				
50	1	1159,73	1123,03	62,31	42,81	3,81
	2	1081,60				
	3	1160,21				
	4	1090,59				
68	1	943,33	933,43	68,67	20,73	2,22
	2	912,53				
	3	957,56				
	4	920,30				
110	1	900,95	838,32	71,86	42,83	5,11
	2	819,04				
	3	828,22				
	4	805,06				

Tabla 3: Disipación de Clorpirifos en el suelo con contenido de humedad de 75 % de la CC (Datos correspondientes a figura 17).

Tiempo (Días)	N° de repetición	Actividad (dpm)	Promedio (dpm)	Disipación (%)	SD	CV (%)
0	1	2953,63	2978,473	0	117,72	3,95
	2	3119,54				
	3	2835,79				
	4	3004,92				
3	1	2220,58	2479,55	15,75	220,92	8,91
	2	2570,39				
	3	2394,83				
	4	2732,37				
7	1	2022,63	2039,41	31,53	33,85	1,66
	2	2073,06				
	3	2000,29				
	4	2061,64				
15	1	1655,87	1638,61	44,98	21,99	1,34
	2	1613,94				
	3	1658,37				
	4	1626,23				
21	1	1395,84	1386,36	53,45	22,12	1,60
	2	1411,55				
	3	1377,44				
	4	1360,59				

24	1	1237,07	1286,51	56,81	84,70	6,58
	2	1211,43				
	3	1402,09				
	4	1295,44				
38	1	1053,14	1066,58	64,19	26,53	2,49
	2	1055,25				
	3	1106,31				
	4	1051,60				
50	1	848,86	887,40	70,21	45,93	5,18
	2	850,97				
	3	943,68				
	4	906,08				
68	1	773,57	774,91	73,98	19,36	2,50
	2	795,67				
	3	781,06				
	4	749,35				
110	1	738,97	713,69	76,04	20,52	2,88
	2	716,72				
	3	689,18				
	4	709,86				

Tabla 4: Clorpirifos residual en el suelo con contenido de humedad de 50% de la CC (Datos correspondientes a la figura 18).

Tiempo (Días)	N° de repetición	Concentración (ng CLP g ⁻¹)	Promedio (ng CLP g ⁻¹)	SD	CV (%)
0	1	121,08	113,34	5,52	4,87
	2	112,99			
	3	111,04			
	4	108,24			
3	1	97,47	94,72	3,15	3,32
	2	97,14			
	3	90,95			
	4	93,28			
7	1	79,54	82,46	2,09	2,53
	2	82,39			
	3	84,10			
	4	83,80			
15	1	70,31	71,81	1,61	2,24
	2	72,31			
	3	70,74			
	4	73,85			
21	1	64,43	60,86	2,43	3,99
	2	60,33			
	3	59,41			
	4	59,26			

24	1	58,34	56,25	2,07	3,68
	2	56,20			
	3	54,21			
35	1	51,46	49,22	2,72	5,52
	2	51,55			
	3	46,15			
	4	47,70			
50	1	44,11	42,72	1,63	3,81
	2	41,14			
	3	44,13			
	4	41,48			
68	1	35,88	35,51	0,79	2,22
	2	34,71			
	3	36,42			
	4	35,00			
110	1	34,27	31,89	1,63	5,11
	2	31,15			
	3	31,50			
	4	30,62			

Tabla 5: Clorpirifos residual en el suelo con contenido de humedad de 75% de la CC (Datos correspondientes a la figura 18).

Tiempo (Días)	N° de repetición	Concentración (ng CLP g ⁻¹)	Promedio (ng CLP g ⁻¹)	SD	CV (%)
0	1	112,35	113,30	4,48	3,95
	2	118,66			
	3	107,87			
	4	114,30			
3	1	84,47	94,32	8,40	8,91
	2	97,77			
	3	91,09			
	4	103,93			
7	1	76,94	77,58	1,29	1,66
	2	78,85			
	3	76,09			
	4	78,42			
15	1	62,98	62,33	0,84	1,34
	2	61,39			
	3	63,08			
	4	61,86			
21	1	53,09	52,74	0,84	1,60
	2	53,69			
	3	52,39			
	4	51,75			

24	1	47,06	48,94	3,22	6,58
	2	46,08			
	3	53,34			
	4	49,28			
38	1	40,06	40,57	1,01	2,49
	2	40,14			
	3	42,08			
	4	40,00			
50	1	32,29	33,76	1,75	5,18
	2	32,37			
	3	35,90			
	4	34,47			
68	1	29,43	29,48	0,74	2,50
	2	30,27			
	3	29,71			
	4	28,50			
110	1	28,11	27,15	0,78	2,88
	2	27,26			
	3	26,22			
	4	27,00			

Tabla 6: Recuento microorganismos aerobios mesófilos (Datos correspondientes a la figura 21).

To			
N° de repetición	Ufc/g suelo seco (x10 ⁻⁶)	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)
1	1,41	2,70	2,50
2	2,08	2,20	2,90
3	2,20	4,00	3,70
4	2,50	8,00	8,20
5	2,10	2,00	1,00
6	3,00	5,00	3,00
7	6,00	DCPC*	8,00
8	8,00	DCPC*	DCPC*

*DCPC: Demasiadas colonias para contar

T _{1/2}		
N° de repetición	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)
1	4,00	1,00
2	3,00	4,00
3	2,50	2,70
4	2,90	2,10
5	3,00	1,00
6	1,00	2,00
7	2,00	6,20
8	6,40	2,90

T _f		
N° de repetición	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)	Ufc/g suelo a 50% de la CC (x10 ⁻⁶)
1	1,12	1,01
2	1,02	1,04
3	1,10	1,19
4	1,21	1,25
5	2,30	3,60
6	3,30	4,50
7	4,80	2,10
8	4,00	2,70

Tabla 7: Tasa de degradación de Clorpirifos (Datos correspondientes a la figura 22).

Tiempo (Días)	Concentración (ng g ⁻¹) 50% de la CC	Concentración (ng g ⁻¹) 75% de la CC
0	113,34	113,30
3	94,72	94,32
7	82,46	77,58
15	71,81	62,33
21	60,86	52,74
24	56,25	48,94
35	49,22	40,57

Tabla 8: Factor de combustión (FC) equipo oxidizador biológico.

Fecha de medición	N° de repetición	Manitol (dpm)	STD Clorpirifos* (dpm)	STD Clorpirifos** (dpm)	FC
04/04/05	1	112,00	3193,32	2668,62	1,18
	2	107,07	3108,20	2691,26	
07/04/05	1	105,90	3368,30	3073,53	1,06
	2	97,35	3256,33	3199,19	
11/04/05	1	96,34	3363,63	3162,28	1,05
	2	96,99	3447,60	3363,63	
15/04/05	1	95,04	3570,52	3418,57	1,10
	2	92,52	3605,69	3112,48	
19/04/05	1	100,89	3768,83	3581,26	1,06
	2	NC	3641,03	3433,50	
22/04/05	1	94,88	3886,55	3737,65	1,10
	2	NC	3977,16	3415,27	
25/04/05	1	93,37	4130,48	3871,95	1,04
	2	96,37	4074,80	4051,49	
28/04/05	1	83,81	4190,36	4204,50	1,00
	2	89,05	4312,31	4274,73	
02/05/05	1	83,81	4619,68	4040,80	1,07
	2	89,04	4577,66	4530,13	
09/05/05	1	93,01	5586,10	5440,43	1,03
	2	89,41	5733,71	5565,98	
24/05/05	1	91,59	18622,31	17859,06	1,03
	2	91,83	19026,48	18647,67	
13/06/05	1	88,03	3012,22	3019,17	1,00
	2	85,41	3021,54	2992,16	
25/07/05	1	89,10	3283,90	3255,93	1,03
	2	80,22	3284,90	3160,46	

STD Clorpirifos* : Mediciones realizadas directamente por el equipo contador de centelleo.

STD Clorpirifos**: Mediciones realizadas por el equipo contador de centelleo, previa combustión en equipo oxidizador biológico.

NC: No Considerado

Tabla 9: Determinación de humedad suelo Serie O'Higgins.

N° de repetición	Peso cápsula (g)	Peso cápsula + suelo seco al aire (g)	Peso cápsula + suelo seco a 105°C (g)	Humedad (%)
1	47,04	57,18	56,80	3,87
2	48,87	58,51	58,14	3,93
3	47,94	58,19	57,80	3,89

Tabla 10: Determinación de masa de agua necesaria para llevar muestra de suelo de 100 g a 50 y 75% de la CC.

Humedad (%)	Factor de Humedad (fh)	Capacidad de campo (%)*	75% de la CC (%)	50% de la CC (%)
3,9	1,04	30,73	23,05	15,36

* Dato determinado con anterioridad por otro estudio en el mismo suelo.

Tabla 11: Curva de calibración de determinación de materia orgánica del suelo Serie O'Higgins.

C (mg mL ⁻¹)	Absorbancia a 600 nm
0	0,579
10	0,796
20	1,006
30	1,224
40	1,471
50	1,685

Tabla 12: Determinación de MO suelo Serie O'Higgins.

N° de repetición	Peso suelo (g)	Absorbancia	CO (%)	MO (%)
1	0,753	0,915	2,49	4,30
2	0,765	0,958	2,77	4,78
3	0,751	0,970	2,91	5,02
4	0,762	0,960	2,79	4,82

Tabla 13: Determinación de pH suelo Serie O'Higgins.

Muestras	N° de repetición	pH	Promedio
Suelo en H ₂ O	1	7,18	7,17
	2	7,16	
Suelo en CaCl ₂	1	6,59	6,61
	2	6,62	

ANEXO V
CÁLCULOS DESARROLLADOS

Determinación de humedad

El contenido de humedad se calculó sobre la base de la diferencia de masa entre el suelo seco al aire y el suelo seco a 105°C, expresado en valores de porcentaje, como se describe a continuación:

$$\text{Humedad del suelo (\%)} = \frac{A - B}{B - C} \times 100$$

Donde:

- A : masa de suelo seco al aire más la masa de la cápsula, (g).
- B : masa de suelo seco a 105°C más la masa de la cápsula, (g).
- C : masa de la cápsula, (g).

Determinación de volumen (ó masa) de agua necesaria para llevar el suelo a 50 y 75% de la CC.

La determinación de volumen (ó masa) de agua necesaria para llevar 100 g de suelo al aire a 50 y 75% de la CC, se calculó a partir de la humedad presentada por el suelo seco al aire, considerando el factor de corrección por humedad (fh) de la siguiente forma:

$$fh = \frac{100 + \text{humedad (\%)}}{100}$$

Luego se calculó la masa de suelo seco a 105°C a partir del peso del suelo seco al aire corregido por fh de la siguiente manera:

$$\text{Masa del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C (g)} = \frac{100}{fh}$$

Donde el valor de 100 corresponde a la masa en gramos de la muestra de suelo seco al aire.

Posteriormente con estos resultados se calculó la masa real de agua presente en la muestra de suelo seco al aire:

$$\text{Masa real de agua presente en } = [100 - \text{Masa del suelo seco a } 105^{\circ}\text{C (g)}] \\ \text{suelo seco al aire (g)}$$

Finalmente la masa de agua necesaria para llevar la muestra de suelo a un determinado % de la CC total, se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Masa de agua (g ó mL)} = \frac{(A * B)}{D} - C$$

Donde:

- A : masa suelo seco a 105°C (g) corregido por el factor de humedad fh.
- B : % de la CC que se desea llevar la muestra de suelo.
- C : masa de agua real que contiene la muestra de suelo seco al aire, (g).
- D : masa de suelo seco al aire, (g).

Determinación de materia orgánica

La determinación de la concentración de carbono orgánico (CO) que contienen las muestras de suelo se realizó de acuerdo al valor de carbono (C) interpolado de la curva de calibración y aplicando la siguiente relación:

$$\text{CO (\%)} = \frac{(A - B) * 1,2 * 100 * fh}{s}$$

Donde:

- A : masa de C que contiene la muestra de suelo, (mg).
- B : masa de C que contiene el blanco, (mg).
- s : masa de la muestra de suelo, (mg).
- fh : factor de corrección por humedad.

Debido a que la materia orgánica contiene aproximadamente un 58% de carbono orgánico (CO), para obtener el contenido de materia orgánica (MO), el valor porcentual de CO, se multiplicó por el factor empírico de 1,72 (100:58) de la siguiente forma:

$$\text{MO (\%)} = \text{CO (\%)} * 1,72$$

Determinación de masa de ^{14}C Clorpirifos (^{14}C -CLP).

Se calculó para la fecha de realización del experimento el contenido de ^{14}C -CLP (en mg) que contiene la solución de ^{14}C Clorpirifos que se utilizó, de acuerdo a los siguientes pasos:

- De acuerdo a la actividad específica de ^{14}C Clorpirifos certificada por el fabricante, el compuesto (8,3 mCi/mmol) y la masa molar (0,3506 g/mmol) se tiene:

$$8300 \mu\text{Ci} \rightarrow 350,6 \text{ mg } ^{14}\text{C-CLP}$$

- De acuerdo a tabla 1 $\mu\text{Ci} \rightarrow 2,22 \times 10^6$ dpm, por lo tanto los 8300 μCi presentados por la muestra corresponden a $1,84 \times 10^{10}$ dpm, equivalentes a 350,6 mg de ^{14}C -CLP.
- Para determinar el contenido de ^{14}C -CLP en la solución de ^{14}C Clorpirifos, se midió por CCL los dpm de la solución, y la cantidad de ^{14}C -CLP se despejó de la siguiente relación:

$$1,84 \times 10^{10} \text{ dpm} \rightarrow 350,6 \text{ mg de } ^{14}\text{C-CLP}$$

$$4,31 \times 10^8 \text{ dpm} \rightarrow X$$

- Por lo tanto al momento de realizar el presente trabajo, la solución de ^{14}C Clorpirifos contiene 8,21 mg de ^{14}C -CLP.

Fortificación del suelo con ^{14}C Clorpirifos (CLP-E).

Para que la fortificación del suelo con ^{14}C Clorpirifos sea cuantificable por el equipo CCL y se disponga de la suficiente radiactividad en el tiempo de muestreo, garantizando una tasa de recuento satisfactoria a lo largo de todo el experimento, la muestra debe presentar una radiactividad mínima de 5000 dpm por gramo de suelo, por lo tanto para fortificar 2700 g de suelo, se calculó el valor de dpm de acuerdo a la siguiente relación:

$$1 \text{ g de suelo} \rightarrow 5000 \text{ dpm}$$

$$2700 \text{ g de suelo} \rightarrow X$$

Con lo anterior, la fortificación de 2700 g de suelo requirió de una cantidad de ^{14}C Clorpirifos correspondiente a una radiactividad de $1,35 \times 10^7$ dpm, que se muestra a continuación:

$$4,31 \times 10^8 \text{ dpm} \rightarrow 8,21 \text{ mg de } ^{14}\text{C-CLP}$$

$$1,35 \times 10^7 \text{ dpm} \rightarrow X$$

De esta manera para que la fortificación del suelo con ^{14}C -CLP sea detectable y cuantificable sin inconvenientes experimentales, la solución fortificante debe contener 0,257 mg de ^{14}C -CLP.

Finalmente y de acuerdo a la dosis de aplicación en campo del insecticida, (10 mg/kg de suelo) se fortificó el suelo (dispuesto en dos bandejas, ambas con 2700 g correspondientes a cada tratamiento de humedad) con 0,257 mg de ^{14}C -CLP y 27 mg de CLP (Clorpirifos comercial, sin marcar).

NOTA: La verificación de la correcta homogeneización de los suelos fortificados, se realizó midiendo la actividad de diferentes muestras de suelo tomadas en cada balde, con un coeficiente de variación (CV) entre ellos menor a 5%.

Determinación de ^{14}C lorpirifos residual en el suelo

La determinación de ^{14}C lorpirifos residual se realizó combustionando y cuantificando la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ recuperado en el suelo, de acuerdo a la cantidad de desintegraciones por minuto (dpm) que registró la muestra. La actividad (dpm) que registró cada muestra de suelo en el equipo CCL, fue corregida con respecto a la actividad (dpm) registrada por el blanco (Manitol) y al factor de combustión (FC) del equipo Oxidizador biológico:

$$\text{Actividad corregida de la muestra (dpm)} = [\text{Actividad muestra} - \text{Actividad Manitol}] * \text{FC}$$

Posteriormente a partir de la actividad corregida se calculó la cantidad de ^{14}C -CLP (ng) presente en ella, de acuerdo a la cantidad de ^{14}C -CLP que contiene la solución de ^{14}C lorpirifos inicial, a través de:

$$4,31 \times 10^8 \text{ dpm} \rightarrow 8,21 \times 10^6 \text{ ng de } ^{14}\text{C-CLP}$$

$$\text{dpm muestra} \rightarrow \text{ng de } ^{14}\text{C-CLP de la muestra}$$

Finalmente la determinación del porcentaje (%) de disipación de Clorpirifos se calculó (considerando como 100% a la actividad registrada para la muestra correspondiente al tiempo cero), de la siguiente forma:

$$\text{Disipación (\%)} = 100 - \frac{[\text{Actividad muestra de suelo corregida (dpm)} * 100]}{\text{Actividad muestra de suelo corregida en tiempo cero (dpm)}}$$