



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Laboratorio de Bioquímica y Química de Suelos

ESTUDIO DE LA AFINIDAD ENTRE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA DE LAS AGUAS NATURALES Y CLORPIRIFOS.

Memoria para optar al Título de Químico

FRANCISCA DANIELA MUÑOZ SUBAN

Patrocinante y Director de Memoria:
DRA. TATIANA GARRIDO REYES

Santiago, Chile.

2014

AGRADECIMIENTOS

Es difícil escribir algunas palabras que demuestren en su totalidad lo que siento al terminar este camino, un tanto largo, pero lleno de alegrías y desafíos cumplidos. Finalmente miro hacia atrás y me doy cuenta que es mucha la gente que ha estado conmigo en estos años. Es por eso que quiero agradecer en primer lugar a mis padres, pilares fundamentales en mi vida que nunca dudaron de mis capacidades y siempre estuvieran atentos frente a los problemas que se me presentaban y que en una abrir y cerrar de ojos los solucionaban o me daban las herramientas para hacerlo, también a mi tía Marylin, profesora de biología que me enseñó lo que es aprender ciencias pero al parecer también de manera no intencionada lo que es enseñarlas. A mis hermanos por abrirme un mundo que yo no conocía a través de la música, historias y conversaciones. Mis tías, tíos y primos, por los momentos de conversación, vacaciones regaladas y preocupación. También dejo un espacio especial para mi compañero de ruta Jorge, quien me ha acompañado en gran parte de este viaje con incondicionalidad. Tampoco puedo olvidar a mi familia universitaria, compañeros y amigos de carrera, el mítico grupo llamado G8, quienes me han regalado, momentos alegres a través de los momentos de ocio que sin duda terminaban y seguirán terminado en risas infinitas y reflexiones de como cambiar el mundo y nuestra querida casa de estudio. Termino agradeciendo al grupo de personas que conocí en el laboratorio haciendo esta tesis, en especial a mi profesora guía Tatiana por recibirme en el laboratorio, por la paciencia de la demora de esta entrega y sobre todo por su gran capacidad de empatía, escuchándome y

alentándome en todo momento. Insisto en la incapacidad de poder nombrar a toda la gente de manera individual y las formas en que me han ayudado, pero no me cabe nada más que decir que ¡GRACIAS!, totales.

RESUMEN

El aumento de la población ha traído como consecuencia un incremento en las actividades agrícolas, lo cual está directamente relacionado a los residuos generados por esta actividad, que pueden afectar el medioambiente, como es el caso de la utilización de pesticidas orgánicos. A nivel nacional uno de los pesticidas más utilizados es el clorpirifos (CP) O,O-dietil O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il) fosforotioato, este pesticida pertenece a la clase de los insecticidas, ya que se utiliza en el hogar, en la ganadería y en la agricultura para el control de diversas plagas. A nivel químico el clorpirifos corresponde a un compuesto organofosforado el cual posee una vida media entre 60-120 días. Para la vida humana, la EPA clasifica al clorpirifos como un pesticida de clase II: o moderadamente tóxico. La toxicidad de este compuesto puede ser incrementada por la presencia de sus metabolitos, como por ejemplo, el clorpirifos-oxon (CPO), que es producto de la oxidación del clorpirifos.

Uno de los componentes presentes en el suelo que puede modificar la disponibilidad y movilidad de los contaminantes es la materia orgánica, la cual puede ser subdividida en materia orgánica insoluble (MOI) y materia orgánica disuelta (MOD), siendo esta última capaz de movilizarse hacia aguas superficiales, interaccionando con los contaminantes presentes en éstas.

La MOD, se define operacionalmente como aquella fracción que pasa a través de un filtro de tamaño de poro 0,45 μm . Su composición química consiste en una variedad de macromoléculas que pueden dar origen a un microambiente hidrofóbico, facilitando de

esta manera la interacción con contaminantes orgánicos altamente hidrofóbicos. La MOD puede ser subdividida de acuerdo a su peso molecular e hidrofobicidad, características que pueden modificar la capacidad de formar complejos con los contaminantes orgánicos, influyendo en el destino final de éstos.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la técnica de cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (GC- μ ECD). En una primera etapa se optimizaron las condiciones cromatográficas para determinar ambos analitos, y establecer los parámetros analíticos de la técnica, luego en una segunda etapa se desarrolló una metodología de extracción del analito desde la matriz acuosa, mediante extracción en fase solida (SPE). Finalmente se evaluó la posible interacción entre CP-MOD y CPO-MOD en una muestra de aguas del rio Bio Bío, obtenidas en distintos sectores (Mulchén y Laja), que representan distintas actividades humanas.

Considerando la optimización de las condiciones cromatográficas se logró identificar y cuantificar CP y CPO con un coeficiente de resolución de 3,8. Con respecto a los parámetros analíticos para el CP y CPO se obtuvieron los siguientes resultados: sensibilidad de 1,145 y 0,042 ($\mu\text{g/L}$); un coeficiente de correlación (r) 0,999 y 0,999; rango lineal de 5-350 y 80-300 ($\mu\text{g/L}$); límite de detección de 2,00 y 32,7 ($\mu\text{g/L}$) y límite de cuantificación de 3,73 y 65,1 ($\mu\text{g/L}$), respectivamente. En relación al desarrollo de una metodología para la SPE, se pudo establecer que mediante la extracción con discos de C-18 los porcentajes de recuperación fueron entre 60-69%. Con respecto a la interacción de la MOD-analitos, se observó que la MOD proveniente de Mulchén

(fuente natural) interaccionó con CP. No fue posible observar esta interacción con la MOD de distinto peso molecular ya que se ha descrito que estos analitos interaccionan con el material de plástico empleado en este estudio.

Se puede concluir a partir de los resultados que es posible detectar y cuantificar los analitos CP y CPO usando la técnica de SPE en discos en una misma muestra a través de GC- μ ECD con cifras de merito adecuadas para la determinación en matriz acuosa como aguas superficiales. Además se concluye que la MOD proveniente de aguas del rio Bio Bío, en el sector de Mulchén, interacciona con el CP.

SUMMARY

STUDY OF THE AFFINITY BETWEEN CHLORPYRIFOS AND DISSOLVED ORGANIC MATTER IN NATURAL WATERS

The increase in population has resulted in an increase in agricultural activities, which is directly related to the waste generated by this activity, which may affect the environment, such as the use of organic pesticides. Nationally one of the most widely used pesticides is chlorpyrifos (CP) O, O- diethyl O-(3,5,6- trichloropyridin -2 - il) phosphorothioate, this pesticide belongs to the insecticides class, as it is used at home, in livestock and in agriculture to control various types of pests. Chemically chlorpyrifos corresponds to an organophosphorus compound which has a half life of 60-120 days. For human life, EPA classifies chlorpyrifos as a class II pesticide: moderately toxic. The toxicity of this compound may be enhanced by the presence of its metabolites, for example, chlorpyrifos - oxon (CPO), which is an oxidation product of chlorpyrifos.

One of the components present in the soil that can modify the availability and mobility of contaminants is organic matter, which can be subdivided into insoluble organic matter (IOM) and dissolved organic matter (DOM), the latter being able to mobilize towards surface waters, interacting with contaminants in them.

MOD, is operationally defined as the fraction that passes through a filter of pore size 0.45 μm . Its chemical composition consisting of a variety of macromolecules can lead to a hydrophobic microenvironment, thereby facilitating interaction with highly

hydrophobic organic contaminants. The MOD can be subdivided according to their molecular weight and hydrophobicity, features which can change the ability to form complexes with organic contaminants, affecting the ultimate destination of these.

For the development of this research, the technique of gas chromatography with electron capture detector micro (GC- μ ECD) was used. In a first step the chromatographic conditions were optimized to determine both analytes, and setting the analytical technique parameters, then in a second step a methodology of extraction of the analyte is developed from the aqueous matrix by solid phase extraction (SPE). Finally the possible interaction between CP-MOD and CPO-MOD was evaluated in a sample of water from the river Bio Bio, obtained in different sectors (Mulchén and Laja), representing different human activities.

Considering the optimization of the chromatographic conditions was possible to identify and quantify CP and CPO with a resolution coefficient of 3,8. Regarding the analytical parameters for the CP and CPO the following results were obtained: sensitivity of 1.145 and 0.042 (mg / L); a correlation coefficient (r) 0.999 and 0.999; linear range of 5-350 and 80-300 (μ g / L); detection limit of 2.00 and 32.7 (μ g / L) and limit of quantification of 3.73 and 65.1 (μ g / L), respectively. In relation to development of a methodology for SPE, it was established that by extraction with C-18 disks, recovery rates were between 60-69%. Concerning to the interaction of the MOD-analytes, it was observed that the MOD from Mulchén (natural source) interacted with CP. It was possible to observe the

interaction with different molecular weight MOD as described that these analytes interact with the plastic material employed in this study

It can be concluded from the results that can detect and quantify analytes CP and CPO using the technique of SPE disks in the same sample by GC- μ ECD cyphers of merit for determining appropriate aqueous matrix and surface water. Furthermore it is concluded that the MOD from Bio Bio river water in Mulchén sector interacts with the CP

INDICE

1. INTRODUCCION	15
1.1. Generalidades.	15
1.2. Información general y química del clorpirifos.	16
1.3. Descripción de la matriz de estudio.	20
1.4. La Materia orgánica disuelta (MOD).	21
1.5. Cuantificación del clorpirifos en matriz acuosa.	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA.	24
3.1. Materiales, instrumentos y reactivos.	24
3.2. Metodología	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1. Caracterización fisicoquímicas de la aguas muestreadas.	38
4.2. Obtención y caracterización físico química de la MOD.	38
4.3. Fraccionamiento por peso molecular.	40

4.4.	Cuantificación de clorpirifos y clorpirifos oxon.	43
4.4.1.	Desarrollo del programa de temperatura y condiciones del equipo.	43
4.4.2.	Determinación de los parámetros analíticos de la técnica.	47
4.4.3.	Calculo de límite de detección y cuantificación	49
4.4.4.	Precisión del método	52
4.5.	Extracción de analitos desde matriz acuosa.	54
4.5.1.	SPE con cartuchos.	54
4.5.2.	SPE con discos.	56
4.6.	Interacción CPO-MOD y CP-MOD en matriz acuosa.	60
4.6.1.	Preparación de las mezclas para la interacción	60
4.6.2.	Interacción de MOD-CP-CPO.	62
4.7.	Afinidad entre clorpirifos y clorpirifos oxon con grupos funcionales.	65
5.	CONCLUSIONES	67
6.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.	69
7.	ANEXO	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química del clorpirifos.	17
Figura 2: Reacción de oxidación del clorpirifos.	19
Figura 3: Mapa que describe los puntos de muestreo para aguas y suelos de la VIII Región. ...	26
Figura 4: Procedimiento de SPE en cartuchos para análisis de CP y CPO.....	32
Figura 5: Procedimiento de SPE de CP y CPO en matriz acuosa usando discos de C-18.....	35
Figura 6: Descripción del proceso de interacción de las muestras mediante ultrafiltración en tubos Amicon.....	37
Figura 7: Descripción del proceso de interacción de las muestras sin ultrafiltración de las muestras.....	37
Figura 8: Espectro ¹ HRMN de la MOD de los puntos 1 y 2 de muestreo.	39
Figura 9: Espectro IR-TF de la MOD (<i>fracción menor a 0,45 μm</i>)......	40
Figura 10: Espectro IR-TF de la MOD en <i>fracción mayor a 1 kDa</i>	42
Figura 11: Espectro IR-TF de la MOD en <i>fracción menor a 1 kDa</i>	42
Figura 12: Cromatogramas de CP y CPO en condiciones cromatográficas preliminares.	43
Figura 13: Cromatograma de una muestra de CP y CPO en condiciones cromatográficas preliminares.....	44
Figura 14: Cromatograma utilizado para cálculo de R _s :.....	46
Figura 15: Cromatograma de CP y CPO en las condiciones cromatográficas optimizadas (CPO, CP y PCB están en una concentración de 1236, 219 y 103μg/L respectivamente).	47
Figura 16: Curva de calibración de clorpirifos	48
Figura 17: Curva de calibración de clorpirifos oxon.	49

Figura 18: Cromatograma obtenido para una mezcla CPO, CPO y SI a una concentración 100 $\mu\text{g/L}$ aproximadamente.	52
Figura 19: Preparación de solución inicial para SPE en cartuchos	54
Figura 20: Porcentaje de recuperación para distintas marcas de cartuchos.	55
Figura 21: Estructura de cartuchos Waters-Oasis HLB.	56
Figura 22: Preparación de solución inicial para SPE en discos	57
Figura 23: Porcentaje de recuperación (R%) en discos para CP y CPO.	57
Figura 24: Preparación de solución inicial para SPE en cartuchos, condiciones de secada de 1 hora y 30°C	58
Figura 25: Valores de %R para CP y CPO en discos.....	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades fisico-químicas del clorpirifos.....	18
Tabla 2: Descripción de los puntos de muestreo de las aguas del río Bio Bío, VIII región.....	26
Tabla 3: Concentraciones de soluciones madre para análisis en GC.....	29
Tabla 4: Concentraciones de soluciones de trabajo para la curva de calibración en n- hexano, incluyendo como estándar interno PCB 101.....	29
Tabla 5: Concentraciones de soluciones de partida para SPE.....	29
Tabla 6: Características fisicoquímicas de las aguas muestreadas en la Región del Bio Bío.	38
Tabla 7: Contenido de carbono orgánico de las fracciones obtenidas de MOD.	41
Tabla 8: Condiciones cromatográficas optimizadas para la separación de CP y CPO.	45
Tabla 9: Programa de temperatura.	45
Tabla 10: Tiempos de retención de los analitos en estudio, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas.	47
Tabla 11: Relación de concentraciones y de área de las soluciones de CP usadas en la curva de calibración.....	48
Tabla 12: Relación de concentraciones y de área de las soluciones de CPO usadas en la curva de calibración.....	49
Tabla 13: Resultados cromatográficos de la inyección de los blancos.	50
Tabla 14: Resultados del LD y LC de CP y CPO mediante el método descrito por la IUPAC, usando GC- μ ECD.	50
Tabla 15: Valores reportados de LD y LC del método para CP usando GC-ECD.	51
Tabla 16: LD y LC de CP, CPO del método usando GC- μ ECD.	51
Tabla 17: Replicabilidad de CP y CPO.....	53
Tabla 18: Repetibilidad de CP y CPO.	53

Tabla 19: Porcentaje de recuperación (%R) de SPE usando distintas marcas de cartuchos.....	55
Tabla 20: Porcentaje de recuperación (%R) de SPE en discos usando distintas condiciones de secado.....	57
Tabla 21: Porcentaje de recuperación en función del la temperatura y tiempo de secado de muestras independientes de CP y CPO.	59
Tabla 22: Valores de %R para CP y CPO en discos.....	59
Tabla 23: Concentración de C.O. para muestras de MOD de Mulchén y Laja.....	61
Tabla 24: Concentraciones de CP, CPO y CO de las muestras acuosas.	61
Tabla 25: Concentraciones de las muestras acuosas sin proceso de ultrafiltración entre	62
Tabla 26: Concentraciones de CP y CPO en la fracción mayor a 3kDa, interacción MOD-analito.	63
Tabla 27: Porcentajes de recuperación CPO y CP presente en la fracción mayor a 3 KDa.....	64

ÍNDICE TABLA DE ANEXOS

Tabla A 1: Productos comerciales con clorpirifos como ingrediente activo, regulados por SAG.	75
Tabla A 2: Condiciones del programa base del equipo.....	77
Tabla A 3: Programa de temperatura del programa base del equipo	77
Tabla A 4: Soluciones de sacarosa para la curva de calibración para la determinación de C.O..	77
Tabla A 5: Áreas Relativas de CPO y CP para las muestras sometidas a interacción con MOD.	78

INDICE DE FIGURA DE ANEXO

Figura A 1: Espectros ¹ H-RMN para la MOD, publicados por Huizhong y col., 2001.....	76
Figura A 2: Curva de calibración de sacarosa para la determinación de C.O.....	78

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades.

El agua es un recurso natural que es indispensable para el desarrollo de la vida y se encuentra íntimamente ligado con la actividad humana. El acceso a las distintas fuentes de agua es un factor crítico para la supervivencia de todas las formas de vida sobre el planeta, ya sea humana, animal y/o vegetal.

Este recurso es muy abundante en el planeta, ya que cubre las tres cuartas partes de la Tierra, sin embargo, gran parte de ella no es potable, ya que el 97% se encuentra como agua salada, y el porcentaje restante corresponde a agua dulce, de esta última solo el 1% se encuentra disponible para la vida humana en ríos, lagos y napas subterráneas (Errazuriz y col, 1993), dicho todo esto el agua puede ser considerado un bien escaso, siendo su conservación una preocupación a nivel mundial.

Las actividades productivas del ser humano así como el aumento sostenido de la población ha incrementado la generación de toda clase de residuos como los provenientes de la agricultura, de la actividad industrial y de residuos domiciliarios entre otros (Garrido, 2011). Estos residuos podrían tener como destino final algún afluente de

agua natural y podrían estar contribuyendo al aumento en la contaminación presente en ella (Echarri, 2007).

Uno de los tantos tipos de contaminantes que es posible hallar en el agua, son los pesticidas, esto se debe a que Chile es un país con una extensa actividad agrícola, y el uso de estos compuestos, permite controlar las plagas que puedan afectar negativamente esta actividad (Báez y col, 1996). Los pesticidas de uso agrícola se pueden clasificar según su acción específica como: herbicida, insecticida, fungicida, acaricida, bactericida, entre otros (Esteve, 2006).

La contaminación de aguas superficiales y subterráneas con plaguicidas puede deberse a la aplicación directa de éstos, o bien al vertido de aguas residuales industriales o a la lixiviación de suelos tratados con estos compuestos (Lazić y col, 2012). Debido a que la aplicación de pesticidas puede afectar al medio ambiente, en los recientes años se ha puesto más atención al impacto negativo que estos podrían tener en la calidad del agua (Ongley, 1996; Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

1.2. Información general y química del clorpirifos.

El clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il) fosforotioato] (Giesy y col.,1999) (Figura 1) es uno de los insecticidas utilizados en la agricultura chilena, encontrándose en 23 productos registrados en el país, incluyendo aquellos en los cuales se encuentra

asociado a otros pesticidas (Tabla Anexo1). Este pesticida fue descubierto por Dow Company en el año 1962 y se registro por primera vez en los Estados Unidos en el año 1965 para el control de plagas (Lazić y col., 2012).

En el hogar, el clorpirifos se utiliza en el control de cucarachas y pulgas. En la ganadería, se utiliza para el control de garrapatas y en la agricultura en forma de rocío para el control de plagas de cosechas, tales como cochinillas, moscas blancas, trips de la platanera, minadoras, algunos escarabajos y otros insectos (ATSDR, 1997).

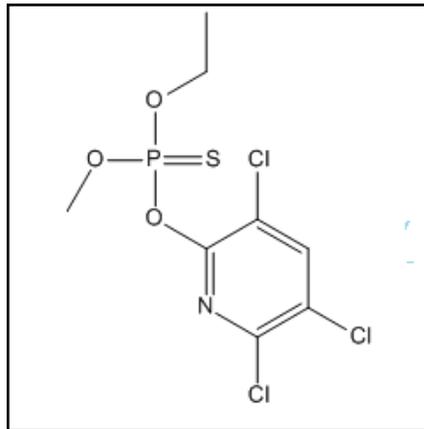


Figura 1: Estructura química del clorpirifos.

El clorpirifos es un sólido cristalino de color blanco, a nivel químico corresponde a un compuesto organofosforado del tipo de los tiones. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se describen en la tabla 1 (Márquez y col., 2010).

Tabla 1: Propiedades fisico-químicas del clorpirifos.

Formula Molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso Molecular	350,62 g/mol
Punto de Fusión	41,5-44 °C
Solubilidad en agua	2 mg/L a 25°C
Solubilidad en otros solventes	Benceno 7900 g/Kg, acetona 6500 g/Kg, cloroformo 6300 g/Kg a 25°C
Log K_{ow}	4,699

Con respecto a la persistencia del clorpirifos en el medio ambiente, se ha encontrado en la bibliografía valores que varían desde los días a los 4 años (Watts, 2012), siendo el rango más reportado de 60 a 120 días (Manahan, 1999), por lo tanto los valores de vida media dependerán directamente de la aplicación, del ecosistema y de distintos factores ambientales. En el caso de las agua los valores de vida media también pueden ser modificados por las características antes mencionadas (Watts, 2012).

A nivel de toxicidad el clorpirifos es altamente tóxico tanto para los peces, como para organismos invertebrados (Geisyy col., 1999). Para la vida humana, la EPA (Environmental Protection Agency) clasifica al clorpirifos como un pesticida de clase II, es decir moderadamente tóxico, esto significa que puede causar efectos en el sistema nervioso central (EPA, 2011), interfiriendo los impulsos nerviosos, debido a que inhibe la enzima acetilcolinesterasa, que es la encargada de transmitirlos (Lazić y col, 2012). La toxicidad de este compuesto puede ser incrementada por la presencia de sus metabolitos,

como por ejemplo, el clorpirifos oxon, que es producto de la oxidación del clorpirifos (Figura 2; EPA, 2011).

En Chile el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) es responsable de establecer las regulaciones que norman la fabricación, comercialización y aplicación de los pesticidas (Quezada, 2011), en relación a los límites máximos permitidos (LMP) el SAG se rige en base al CODEX ALIMENTARIUS, siendo para el clorpirifos el límite entre 0,01-20 mg/Kg para distintos alimentos. En relación al LMP en aguas la OMS propone una concentración de 30µg/L (OMS, 2006), la EPA (2000) propone un límite máximo de 20µg/L para aguas, lo cual significa que no existiría riesgo apreciable para la salud (Hamilton y col., 2003).

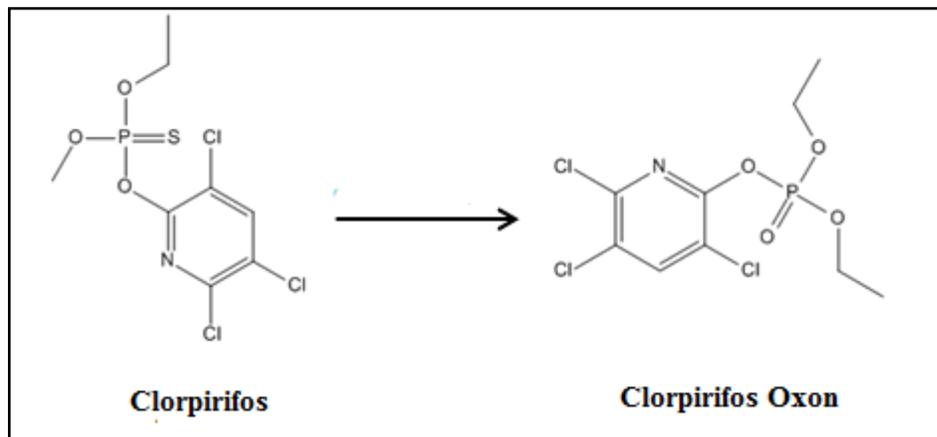


Figura 2: Reacción de oxidación del clorpirifos.

1.3. Descripción de la matriz de estudio.

En el agua también es posible encontrar componentes de sus sistemas aledaños, como lo son los que provienen del suelo, el cual es definido químicamente como un sistema disperso constituido por tres fases: sólida, líquida y gaseosa, donde se distinguen cuatro componentes principales: materia orgánica, material mineral, aire y agua (Navarro, 2003). La materia orgánica (MO) es uno de los componentes más importante desde el punto de vista de movilidad en la química del suelo porque es capaz de modificar la disponibilidad de los contaminantes presentes en el medio, en el estudio de Song y col. (2008) se evaluó la adsorción y desorción del pesticida clorotolurón en suelos, trabajo en el cual se pudo concluir que la presencia de MO podría provocar un aumento en la percolación de este herbicida a aguas subterráneas.

La MO es descrita como un polímero polifuncional heterogéneo, la cual puede ser dividida en materia orgánica húmica y no húmica. Las sustancias húmicas contienen ácido fúlvico y ácido húmico, mientras que las sustancias no húmicas están compuestas por carbohidratos, proteínas, aminos ácidos, ácidos grasos, entre otros (Wang y col., 2008). Existe evidencia que parte de la MO presente en los suelos así como la suministrada por diferentes fuentes es capaz de migrar a sistemas acuáticos, reconociéndose una subfracción denominada materia orgánica disuelta (MOD) (Garrido, 2011; Rodríguez, 2003; Huang y Lee, 2001).

1.4. La Materia orgánica disuelta (MOD).

La MOD, se define operacionalmente como aquella fracción que pasa a través de un filtro de membrana de tamaño de poro 0,45 μm (Santos y col., 2010). La MOD puede provenir tanto de fuentes naturales como fuentes antrópicas, y para una mejor caracterización ésta puede ser subdividida de acuerdo a su peso molecular e hidrofobicidad, factores que pueden modificar la capacidad de formar complejos con diversos contaminantes (Garrido, 2011; Hur y col., 2006; Junoud y col. 2009; Tadini y col., 2013), influyendo en la disponibilidad y movilidad de éstos (Garrido, 2011; Perdeu y Ritchie, 2005; Wang y col., 2008; Sherene, 2010). Hay estudios en los cuales, se ha confirmado que la MOD puede estabilizar a metales pesados a nivel traza, en los poros de agua del suelo, donde en ausencia de MOD la concentración de metales es mil veces más baja que en su presencia (Charriau y col., 2010).

La MOD está conformada por una gran variedad de macromoléculas que pueden proveer un microambiente hidrofóbico que puede facilitar la interacción con contaminantes orgánicos altamente hidrofóbicos (Bejerano y col., 2005). El clorpirifos es un compuesto que presenta una baja solubilidad en agua, por lo tanto tiene una alta afinidad a los tejidos grasos de animales ya que el valor de $\log K_{ow}$ es 4,7 (Tabla 1), por lo tanto a través de estas características fisicoquímicas la bibliografía fundamenta que podría presentarse una interacción con la MOD (Huang y Lee, 2001).

1.5. Cuantificación del clorpirifos en matriz acuosa.

Para realizar la extracción del clorpirifos, desde matriz acuosa se pueden utilizar varias metodologías, como la extracción en fase solida (SPE) o la extracción líquido-líquido (LLE) (Barra y col., 1995), para la SPE se pueden destacar las siguientes ventajas: es una metodología rápida, de manipulación simple, permite una fácil automatización y emplea cantidades bajas de disolventes orgánicos, reduciendo costos y disminuyendo la contaminación por grandes volúmenes de disolvente (Esteve, 2006).

Con respecto a la cuantificación de los analitos de interés se ha descrito la utilización de cromatografía gaseosa acoplada al detector de captura de electrones (GC-ECD) (Lazić y col., 2012 y Marsin y col., 2011), ya que los analitos a medir son compuestos halogenados con aromaticidad (Skoog y col., 2008). La elección de la instrumentación adecuada para la cuantificación de los analitos debe ir acompañada de la optimización de las condiciones cromatográficas para una adecuada resolución de los peaks cromatográficos.

De todo lo anteriormente señalado resalta la importancia de poder cuantificar clorpirifos y su metabolito clorpirifos oxon en matriz acuosa, debido al posible efecto en el medio ambiente. Por otro lado resulta de gran interés poder determinar la interacción entre estos compuestos y la MOD, con el fin de poder observar algún posible efecto en la disponibilidad de los analitos estudiados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la interacción entre clorpirifos y la materia orgánica disuelta, fraccionada por peso molecular, presente en aguas del río Bio Bío.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar y optimizar una metodología por cromatografía de gases con μ -ECD para el análisis de clorpirifos y su metabolito clorpirifos oxon en matriz acuosa.
- Fraccionar la materia orgánica disuelta, presente en aguas del río Bio Bío, por peso molecular.
- Evaluar la interacción entre el insecticida organofosforado y las distintas fracciones de materia orgánica disuelta en sistema acuoso.
- Análisis e interpretación de los resultados.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

3.1. Materiales, instrumentos y reactivos.

a) Materiales e instrumentos.

- Balanza Analítica, precisa 125, Swiss.
- Baño de Secado, Sahara 310, Rocker.
- Capsulas de petri.
- Cartuchos de extracción, C18, con 500mg de relleno, Clean Up Extraction Columns UCT.
- Cartuchos de extracción, C18 con 500mg, Waters Sep-Pak.
- Cartuchos de extracción, Waters Oasis HLB.
- Centrifuga, Z 383 K, HERMLE.
- Cromatógrafo Gaseoso, Agilent Technologies 78901A GC System, Columna, Agilent 19091J-413 (HP-5: 325°C: 30m x 320µm x 0,25µm), Detector de micro captura electrónica.
- Discos de extracción, Envi-Disk de 47 mm de diámetro, Supelco.
- Embudo de vidrio para EFS, Millipore.
- Estufa, WTC Winder.
- Estufa al vacio WTB Winder.
- Handy Step, Plastic Brand.
- Jeringas analíticas de precisión, Vici, (USA).
- Manifold.
- Matraz aforado 50 y 100mL
- Matraz Kitasato 500mL
- Milli Q, Ultra-Pure wáter System.
- Vaso de vidrio y tapon para EFS, Millipore.
- Pinzas metálicas para EFS, Millipore.
- Pinzas plásticas

- Pipetas volumétricas, aforadas y pasteur.
- Sonicador, Elmasonic.
- Tubos Amicon, Millipore 3,0 KDa.
- Vasos precipitados.
- Viales de Vidrio, 2 y 8mL, CRS.

b) Reactivos y soluciones de trabajo

- Agua Destilada.
- Agua Milli Q.
- Acetonitrilo (ACN), pureza HPLC, MERCK, (Germany).
- Azida de Sodio.
- Clorpirifos (CP) (99,5%), Chem Service (USA).
- Clorpirifos oxon (CPO) (99,0%), Chem Service (USA).
- n-hexano (HPLC purity),MERCK, (Germany).
- Nitrógeno alta pureza, Indura, (Chile).
- Metanol, MERCK (Germany).
- PCB 101 (99,0%) Dr Ehrenstorfer.

3.2. Metodología

- Muestreo de aguas.

Para este estudio se eligieron las aguas del río Bio Bío de la VIII Región, por la diversidad de descargas que recoge este río, tales como descargas industriales y domiciliarias, para lo cual se siguió su cauce desde sus inicios, considerándose para este estudio solo 2 puntos de muestreo de las aguas (Tabla 2). El muestreo fue realizado tomando aguas del río cada diez minutos, hasta recolectar un volumen de 2,5 L,

completando un total de 10 muestras por punto. El primer punto de muestreo fue en el sector de Rucalhue (Mulchén), sector donde comienza el río Bío Bío, con un caudal bajo, caracterizado por ser una zona de bajo impacto antrópico. El segundo punto de muestreo se realizó en Laja, entre Nacimiento y San Rosendo, donde el ancho del río alcanza aproximadamente 2 km. La muestra fue tomada desde un bote que se ubicó al medio del río, este sector recibe los desechos de las papeleras que se encuentran en las cercanías (Figura 3). Las muestras de aguas se caracterizaron por medio de análisis estandarizados, tales como determinación de pH, conductividad, sólidos suspendidos y contenido de carbono orgánico.

Tabla 2: Descripción de los puntos de muestreo de las aguas del río Bio Bío, VIII región.

Punto	Sector	Elevación (ft)	S	WO
1	Mulchén	846	37°43'16,9"	72°14'39,7"
2	Laja	139	37°17'02,5"	72°42'59,9"

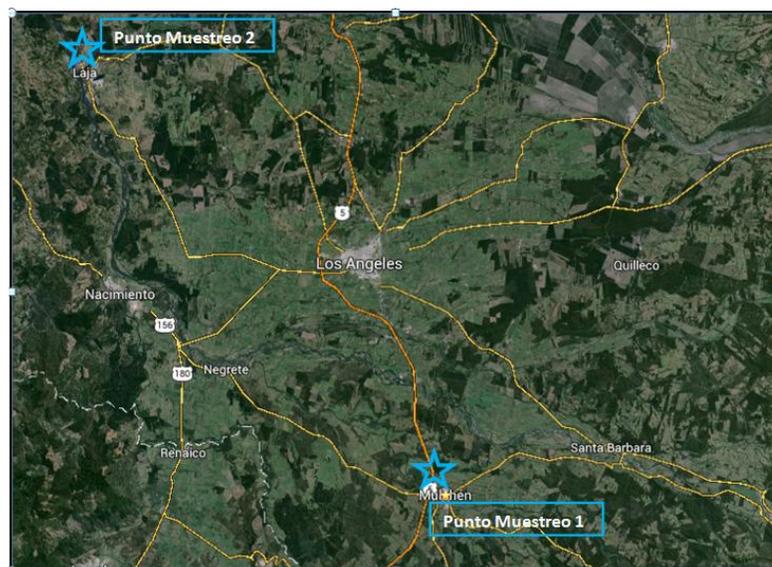


Figura 3: Mapa que describe los puntos de muestreo para aguas y suelos de la VIII Región.

- Obtención de la materia orgánica disuelta (MOD) de aguas naturales.

Las muestras de aguas recolectadas fueron almacenadas a 4°C para su análisis inmediato o bien congeladas para su posterior uso. Las aguas fueron en una primera etapa filtradas mediante papel para luego separar la MOD por medio de filtración con membrana de nitrato de celulosa de 0,45 μm .

- Caracterización de las aguas y la MOD.

Una vez obtenida la MOD y sus fracciones estas fueron analizadas para determinar el contenido de carbono orgánico, y posteriormente se llevaron a evaporación total, mediante estufa al vacío, los sólidos representativos fueron analizados mediante análisis elemental, ^1H RMN y mediante espectroscopia IR con transformada de Fourier, con el objetivo de identificar cualitativamente los principales grupos funcionales presentes en la MOD y sus fracciones.

- Fraccionamiento de la materia orgánica disuelta por peso molecular.

Se realizó el fraccionamiento por peso molecular de la MOD usando una celda de ultrafiltración considerando el tamaño de cutoffs de 1kDa. Se concentraron las muestras en rota vapor hasta un volumen de 50 mL, a las cuales se les adiciono 100 μL de azida de sodio de concentración 100 mg/L, las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta los análisis.

- Cuantificación de clorpirifos y clorpirifos oxon mediante GC- μ ECD.

Se evaluaron parámetros como programa de temperatura y volumen de inyección para la detección y cuantificación de manera simultánea para ambos analitos en solvente n-hexano. También se evaluaron los parámetros analíticos de la técnica como la precisión, límite de detección y cuantificación. Se consideró la utilización del PCB 101 como estándar interno (SI), con el objetivo de mejorar la precisión de los resultados obtenidos por cromatografía gaseosa (GC- μ ECD), la elección del SI se realizó en base a los tiempos de retención de los analitos. Para todos los casos la preparación de las soluciones de trabajo se realizó mediante pesada.

Las soluciones madres para las experiencias con clorpirifos (CP) se prepararon en un rango de 1.200.000- 500 μ g/L y para el clorpirifos oxon (CPO) en un rango de 130.000- 500 μ g/L (Tabla 3) a partir de los estándares puros, estas fueron preparadas usando n-hexano como solvente y fueron guardadas a 4°C previamente a su uso. Las soluciones de trabajo para la construcción de la curva de calibración (Tabla 4) fueron preparadas por dilución de las soluciones madres.

Para el caso de la extracción en fase sólida (SPE) se hicieron nuevas soluciones de partida de CP y CPO a partir de los estándares puros pero usando como solvente una mezcla de Acetonitrilo (ACN)/Metanol (MeOH) (50:50 v/v %), las concentraciones se describen en la Tabla 5. Las soluciones de trabajo que se utilizaron para ambos analitos en la etapa de extracción estaban en un rango de concentración de 20-100 μ g/L. Las muestras utilizadas para la SPE fueron de agua fortificada con ambos analitos, usando las soluciones de trabajo descritas.

Tabla 3: Concentraciones de soluciones madre para análisis en GC.

Solución Madre	Concentración µg/L	
	CP	CPO
Inicial	1273709	127727
1	18123	2610
2	1076	1292
3	506,3	550,0

Tabla 4: Concentraciones de soluciones de trabajo para la curva de calibración en n- hexano, incluyendo como estándar interno PCB 101.

Solución de trabajo	Concentración µg/L		
	CP	CPO	PCB
1	400	397	130
2	382	347	110
3	319	299	115
4	207	207	115
5	146	143	104
6	103	102	103
7	80,7	79	107
8	52,9	48,0	105
9	25,7	17,2	104
10	10,7	-	107
11	5,33	-	105
12	2,23	-	107

Tabla 5: Concentraciones de soluciones de partida para SPE.

Solución Partida	Concentración CP µg/L	Concentración CPO µg/L	
Fecha de preparación de solución	28-08-2013	28-08-2013	02-12-2013
1	463836	442942	175127
2	4771	4914	12598
3	2357	2414	5388

- Extracción de clorpirifos (CP) y clorpirifos oxon (CPO) en matriz acuosa mediante extracción en fase sólida (SPE).

Para la determinación de CP y CPO en matriz acuosa en ausencia y presencia de MOD se realizó SPE utilizando cartuchos y discos con resina C18 de naturaleza apolar, con el fin de optimizar el proceso de SPE.

a) Utilización de Cartuchos:

La extracción de CP y CPO desde aguas superficiales se realizó utilizando un Manifold conectado a la red de vacío según lo descrito por Lazic y col., (2012) pero empleando cartuchos C18. Se usaron tres tipos de marcas de cartuchos: UCTC18, C18 Waters-SepPak y Waters-Oasis HLB, para seleccionar aquel cartucho con mejores valores de recuperación. El procedimiento general de la SPE para los tres tipos de cartuchos fue el siguiente (Figura 4):

1. Los cartuchos fueron acondicionados con 5 mL (3-2mL) de una mezcla acetonitrilo (ACN)/metanol (MeOH) (50/50 %v/v).
2. En la etapa de carga de muestra se usó un volumen de 10mL (5-5mL) de cada muestra a extraer.
3. Después se procede al lavado de los cartuchos con 5mL (3-2mL) de agua MilliQ.
4. Por último los analitos fueron eluidos con 6mL (2-2-2mL) de una mezcla ACN/MeOH (50/50 %v/v).

5. Las muestras eluídas son evaporadas a sequedad a través del paso de una corriente de N_2 por 1 hora a $45^\circ C$ y reconstituidas agregando 2 mL de n-hexano, el cual contiene el SI.

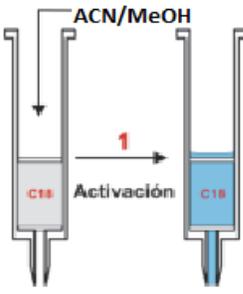
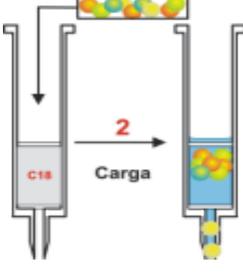
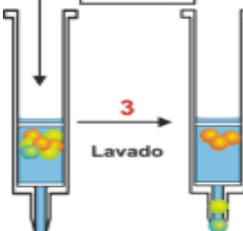
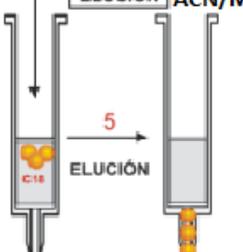
<p>1. Etapa de Acondicionamiento</p>	<p>Se hacen pasar 5 mL (3 y 2mL) de la mezcla acetonitrilo y metanol (50:50 %v/v).</p>	
<p>2. Etapa de Carga de Muestra</p>	<p>Se aplican 10 mL de la muestra (5 y 5mL)</p>	
<p>3. Etapa de Lavado</p>	<p>Se hacen pasar 5 mL (3 y 2mL) de agua Milli Q.</p>	
<p>4. Etapa de Elución</p>	<p>Se hacen pasar 6 mL de la mezcla ACN/MeOH (50:50 % v/v) (2, 2 y 2mL)</p>	
<p>6. Etapa de Concentración</p>	<p>Se hace pasar una corriente de N₂ por 1 hora a 45°C hasta evaporación total del solvente. Después se reconstituye agregando a cada muestra 2mL de n-hexano.</p>	

Figura 4: Procedimiento de SPE en cartuchos para análisis de CP y CPO

b) Utilización de Discos:

La utilización de discos se basó en el método descrito por Lazić y col., (2012), optimizando los volúmenes y la manera de elución de los analitos. Los pasos generales de esta extracción son los siguientes:

1. Los discos (ENVI C18, Supelco) fueron acondicionados con 5 mL de una mezcla ACN/MeOH (50/50 %v/v), seguido de un lavado con 5 mL de agua Milli Q.
2. En la etapa de carga de muestra se uso un volumen de 50mL de cada muestra a extraer.
3. Después los discos fueron secados a 30°C en una estufa al vacío por 1h.
4. Posterior al secado se eluyeron las muestras con 24 mL de una mezcla ACN/MeOH (50/50 %v/v).
5. Por último las muestras eluidas fueron evaporadas a sequedad a través del paso de corriente de N₂ a 45°C y reconstituidas agregando 2 mL de n-hexano que contenía el SI y homogenizadas durante 20 min por medio de ultrasonido.

La modificación aplicada a la técnica original consistió en que después de la etapa 3, cuando los discos se encontraban secos con los analitos retenidos se introdujeron a capsulas de petri y se adicionaron en el interior de la capsula 6 mL de la mezcla

ACN/MeOH (50/50 %v/v). Estos discos fueron sonicados durante 20 minutos para luego vaciar el líquido en un tubo de ensayo, este procedimiento fue repetido 4 veces para cada muestra, alcanzando un volumen final de 24 mL que fue llevado a sequedad (Figura 5).

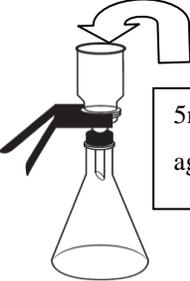
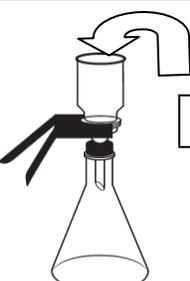
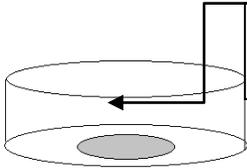
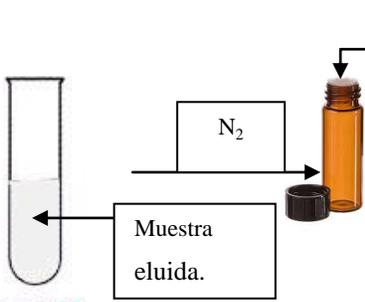
<p>1. Etapa de Acondicionamiento</p>	<p>Se hacen pasar 5 mL de la mezcla de acetonitrilo y metanol (50/50 % v/v), seguido de 5 mL de agua Milli Q.</p>	 <p>5 mL de mezcla y 5 mL agua Milli Q.</p>
<p>2. Etapa de Carga de Muestra</p>	<p>Se aplican 50 mL de la muestra en matriz acuosa.</p>	 <p>50 mL de la muestra.</p>
<p>3. Etapa de secado del disco</p>	<p>El disco se seca al vacio por 1 hora a 30°C.</p>	
<p>4. Etapa de Elución</p>	<p>Se hacen pasar un total 24 mL de ACN/MeOH (50/50 % v/v) (cuatro veces con 6 mL cada vez.)</p>	 <p>6 mL de solvente de elución por 4 veces.</p>
<p>5. Etapa de Concentración</p>	<p>Se pasa una corriente de N₂ por 1 hora a 45°C hasta evaporación total del solvente. Después se reconstituye agregando a cada muestra 2 mL de n-hexano.</p>	 <p>2 mL hexano.</p> <p>Muestra eluida.</p> <p>N₂</p>

Figura 5: Procedimiento de SPE de CP y CPO en matriz acuosa usando discos de C-18.

- Interacción de la MOD con CP y CPO en sistema acuoso.

Para la interacción se prepararon 3 muestras de 50 mL cada una de: MOD Laja+CP+CPO (Muestra 1); MOD Mulchén+CP+CPO (Muestra 2) y H₂O+CP+CPO (muestra 3), esta última se utilizó como blanco. Se tomaron tres alícuotas de 10 mL de cada una de estas muestras (triplicado), las cuales fueron colocadas dentro de los tubos Amicon con una membrana de tamaño de cutoff de 3 kDa, para mediante ultrafiltración separar los extractos en dos fracciones, una mayor a 3 kDa (complejo MOD-CP-CPO que queda sobre la membrana) y otra menor a 3 kDa (complejo MOD-CP-CPO que pasó a través de la membrana), a los cuales se les realizó SPE en discos, para luego realizar la cuantificación por medio de GC- μ ECD (Figura 6).

En una segunda etapa se tomaron dos alícuotas de 10 mL de las soluciones de interacción, de cada punto de muestreo, estas soluciones fueron sometidas al proceso de SPE en discos para su posterior cuantificación como lo indica la Figura 7.

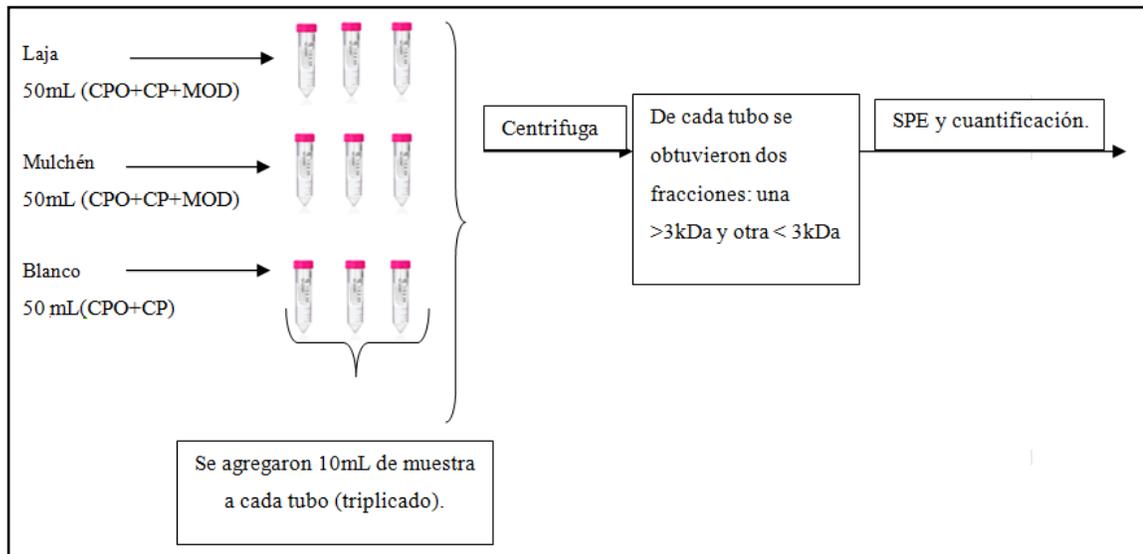


Figura 6: Descripción del proceso de interacción de las muestras mediante ultrafiltración en tubos Amicon

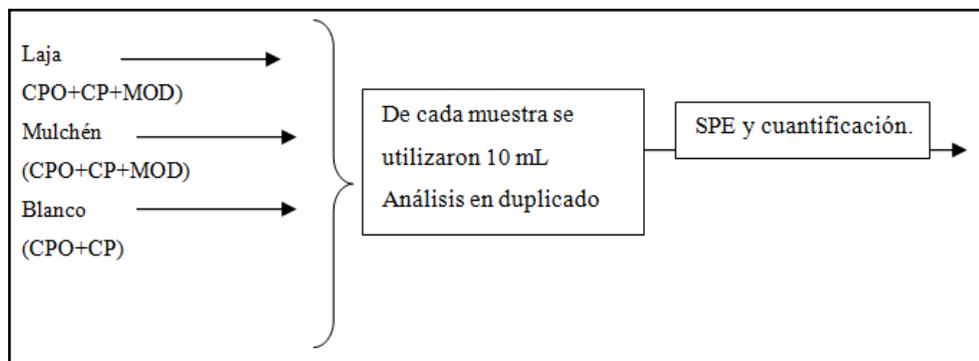


Figura 7: Descripción del proceso de interacción de las muestras sin ultrafiltración de las muestras.

- Relacionar la afinidad de clorpirifos y clorpirifos oxon con la abundancia de grupos funcionales presente en la materia orgánica disuelta.

Se utilizó la información obtenida en los puntos anteriores, como son la información de los IR-TF de cada una de las fracciones obtenidas y los resultados de la interacción MOD-CP-CPO, para correlacionar la presencia y abundancia de grupos funcionales con la afinidad de los analitos en la matriz MOD-solución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización fisicoquímicas de las aguas muestreadas.

En relación a la caracterización de las muestras de las aguas, se pudo observar una diferencia significativa en el contenido de carbono orgánico, donde para el punto de muestreo 2 fue mayor 2,88 mgC/L que el contenido del punto 1 (2,38 mgC/L), la conductividad mostró diferencias significativas en relación al punto de muestreo, siendo de 89,4 y 114,2 $\mu\text{S cm}^{-1}$ para los puntos 1 y 2, respectivamente. Los resultados de la determinación del pH de las aguas fueron similares. En relación a los sólidos suspendidos, los puntos de muestreo 1 y 2 presentaron valores similares de 12,9 g/L (Tabla 6).

Tabla 6: Características fisicoquímicas de las aguas muestreadas en la Región del Bio Bío.

Punto	C org		Conductividad		pH	Sólidos suspendidos	
	mg/L	Desviación estándar	T °C	$\mu\text{S/cm}$		g/L	Desviación estándar
1	2,38	0,07	20,6	89,4	7,63	12,9	0,19
2	3,00	0	20,5	114	7,55	12,9	0,46

4.2. Obtención y caracterización físico química de la MOD.

La MOD obtenida como sólido fue de 70,7 y 63,4 mg por litro de agua de río de los puntos de muestreo 1 y 2, respectivamente. Con respecto al microanálisis elemental de la fracción sólida de la MOD los valores de porcentaje para el punto de muestreo 1 fueron N: 0,1; C: 4,9; H: 1,02 y para el punto de muestreo 2: N: 0,5; C: 4,6; H: 1,04. Los espectros de $^1\text{H-RMN}$ debido a la complejidad de la estructura de la MOD fueron

considerados como un patrón de distribución de señales más que un medio para identificar compuestos específicos (Figura 8). Al comparar ambos puntos de muestreo se observa que en el caso de Mulchén se observa un región alifática (0-4ppm) a diferencia que en Laja esta sección es menos intensa.

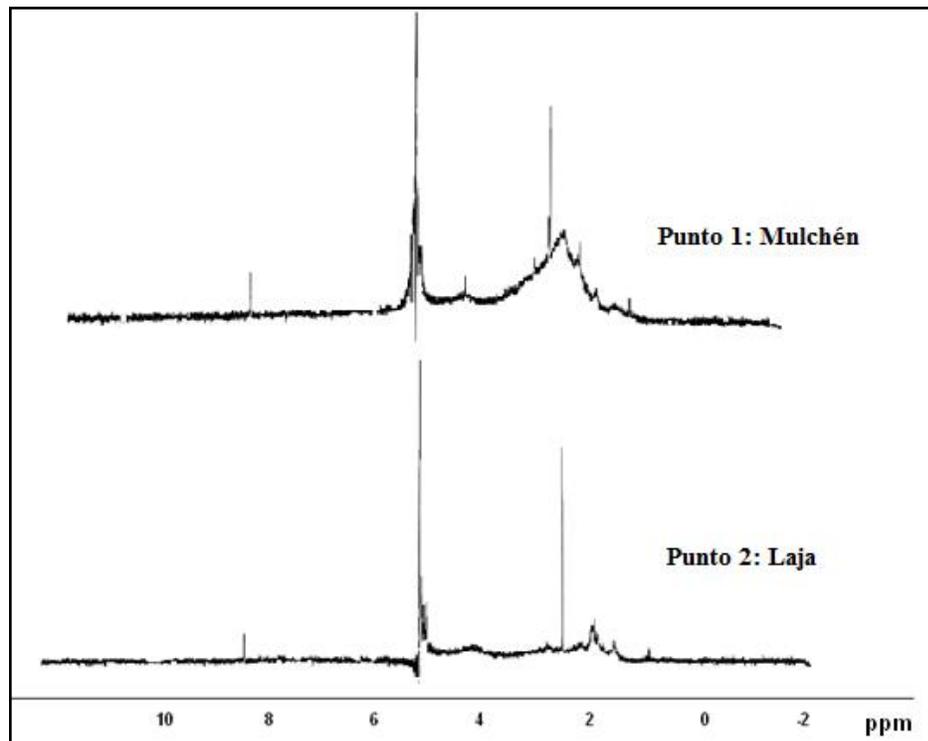


Figura 8: Espectro ^1H RMN de la MOD de los puntos 1 y 2 de muestreo.

Huizhong y col. (2001) publicaron diversos espectros ^1H -RMN (Anexo, Figura A 1) con el fin de caracterizar la MOD de diversas fuentes de aguas provenientes de ríos, lagos y plantas de tratamiento de agua. Según estos investigadores la MOD se clasifica en tres fracciones: ácido húmico, ácido fúlvico y de la fracción hidrofílica. A través de los espectros ^1H -RMN (Figura 8) se puede apreciar que las aguas pertenecientes a

Mulchén podrían estar caracterizadas según estos autores por la fracción de ácido fúlvico mientras que las de Laja por la fracción hidrofílica.

Al observar los espectros IR-TF de la MOD para ambos puntos de muestreo no se observaron grandes diferencias, como lo muestra la figura 9.

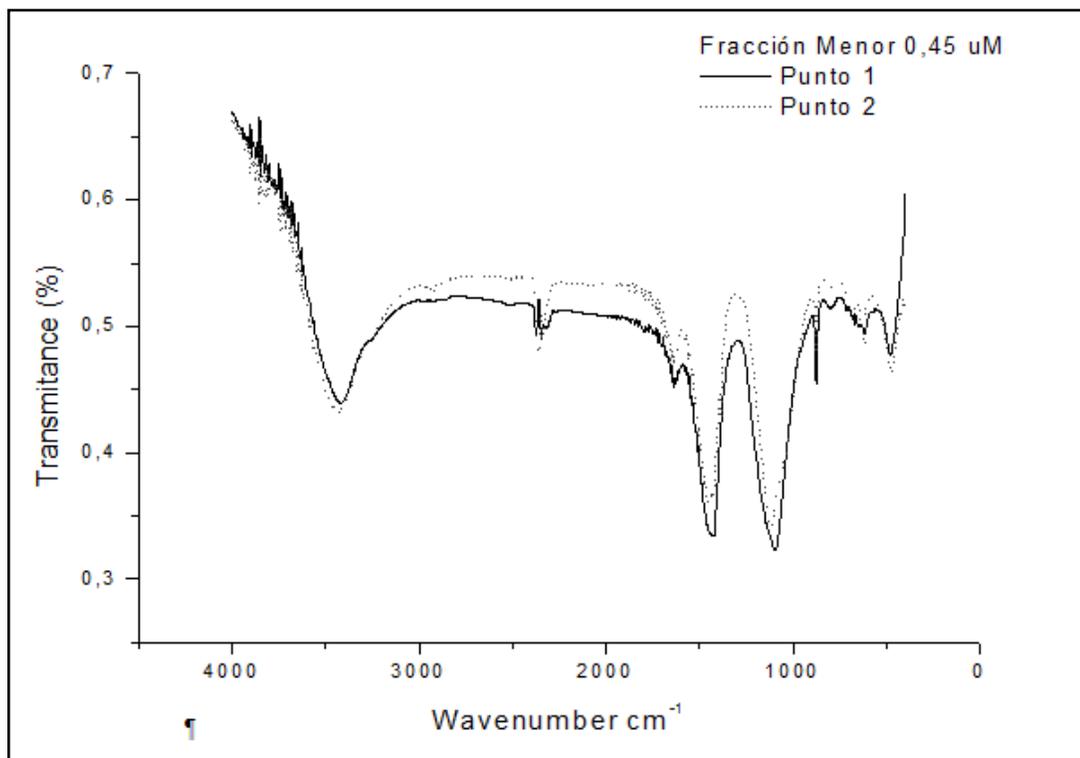


Figura 9: Espectro IR-TF de la MOD (fracción menor a 0,45 μm).

4.3. Fraccionamiento por peso molecular.

Para el fraccionamiento de la MOD por peso molecular se consideró un tamaño de cutoff de 1 kDa, obteniéndose las fracciones: mayor a 1 kDa y menor a 1 kDa. En la tabla 7, se presentan los resultados de la determinación del contenido de carbono

orgánico presente en cada una de las fracciones obtenidas. Al realizar el balance de masa de cada una de las fracciones en comparación a la fracción menor a 0,45 μm , se puede observar que parte de esta MOD se pierde durante el proceso de ultrafiltración, este proceso en general involucra varios días para su realización, por lo tanto, es posible que sigan ocurriendo procesos de degradación de la MOD, así como procesos de adsorción de ésta en la membrana de ultrafiltración utilizada. Los resultados obtenidos mostraron que para los dos puntos de muestreo el contenido de carbono orgánico fue mayor para la fracción mayor a 1 kDa.

Tabla 7: Contenido de carbono orgánico de las fracciones obtenidas de MOD.

Muestra	Fracción	
	Mayor a 1kDa	Menor a 1 kDa
	mg C/ mL	
Punto 1	0,885	0,679
Desviación estándar	0,344	0,091
Punto 2	2,051	1,487
Desviación estándar.	0,435	0

En relación a los espectros de IR-TF obtenidos de la MOD fraccionada por peso molecular de los dos puntos de muestreo de las aguas, se observó para la fracción mayor a 1 kDa (Figura 10) la señal a 2920 cm^{-1} , correspondiente al grupo -OH, señal que no está presente en la fracción menor a 1 kDa (Figura 11). Para la fracción menor de 1kDa se observó una señal en $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ la que puede corresponder a la sustitución de anillo aromático en 1:2:3:5 ó 1:2:4:5.

Los perfiles espectroscópicos de las fracciones de igual peso molecular mayores a 1 kDa, de los dos puntos de muestreo presentan una significativa concordancia (Figura 10 y 11).

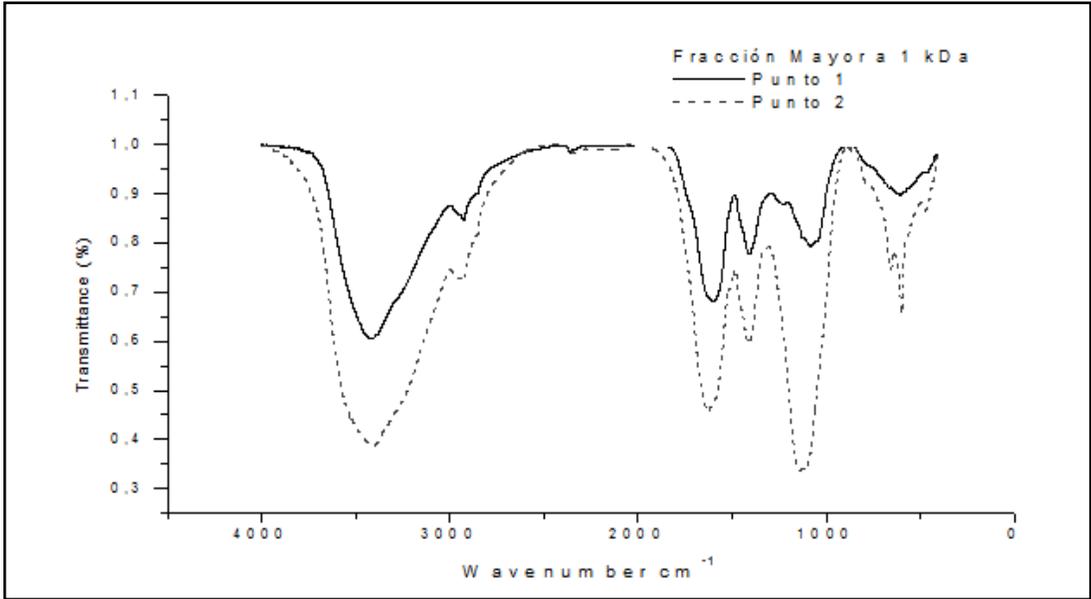


Figura 10: Espectro IR-TF de la MOD en *fracción mayor a 1 kDa*.

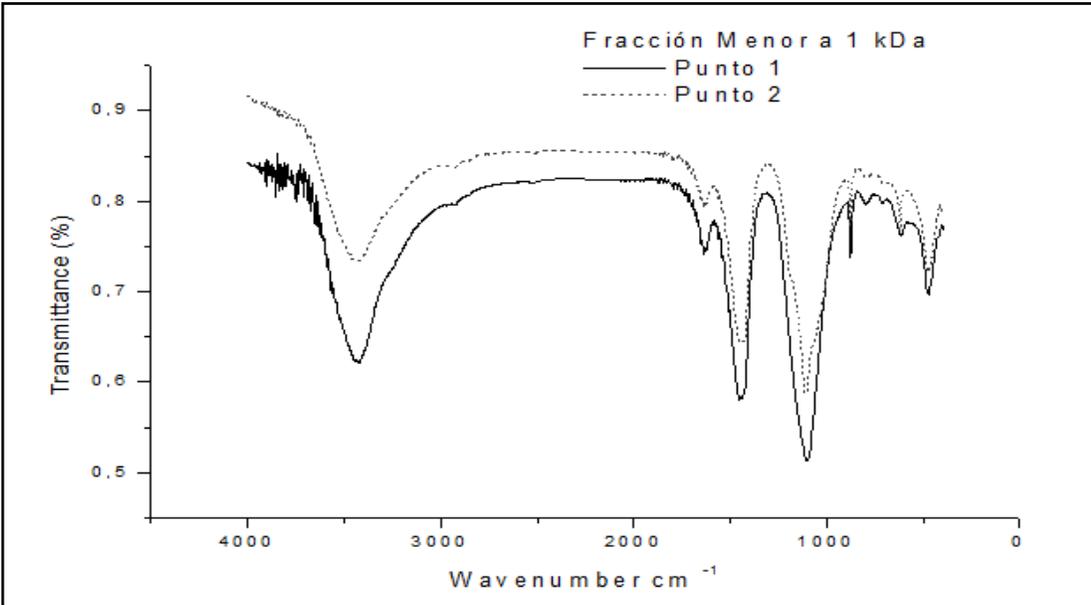


Figura 11: Espectro IR-TF de la MOD en *fracción menor a 1 kDa*.

4.4. Cuantificación de clorpirifos y clorpirifos oxon.

4.4.1. Desarrollo del programa de temperatura y condiciones del equipo.

Con el fin de poder observar y analizar los tiempos de retención y las condiciones del programa de temperatura de ambos analitos se inyectó cada analito, usando un método base del equipo, (Anexo, Tabla A 2 y A 3). Los siguientes cromatogramas corresponden a las primeras inyecciones realizadas para cada analito (Figura 12).

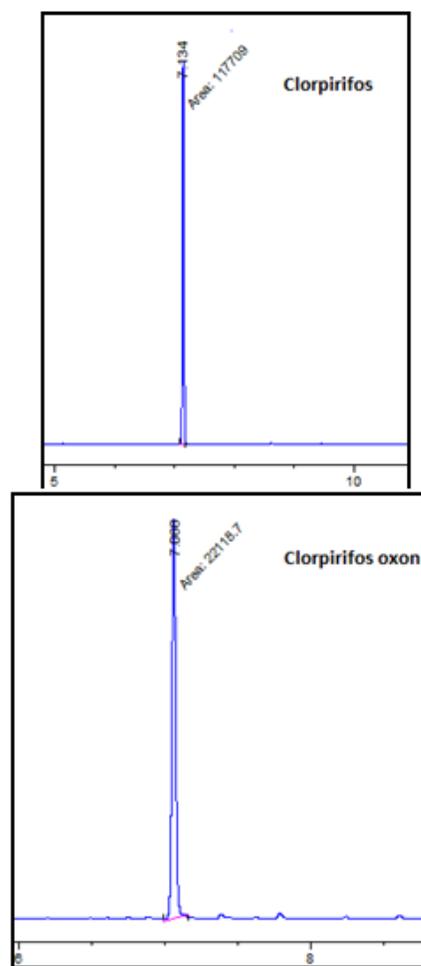


Figura 12: Cromatogramas de CP y CPO en condiciones cromatográficas preliminares.

La señales cromatográficas dieron como resultados tiempos de retención para CP y CPO de 7,1 y 7,0 min, respectivamente. Al realizar una nueva inyección de una mezcla de ambos analitos en una concentración de CP y CPO de 441µg/L y 431µg/L, respectivamente, los cromatogramas obtenidos presentaron una baja resolución (Figura 13) por lo que fue necesario optimizar las condiciones cromatográficas para mejorar la resolución de los peaks.

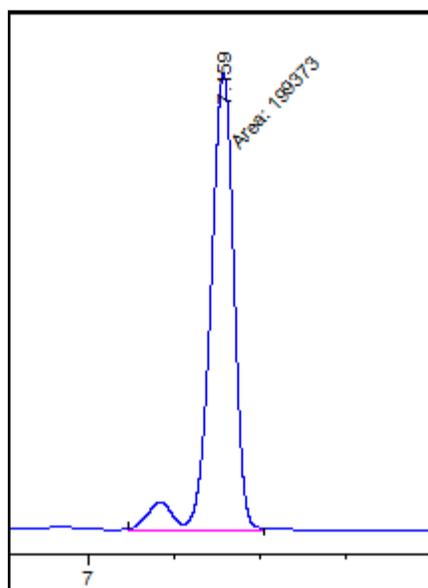


Figura 13: Cromatograma de una muestra de CP y CPO en condiciones cromatográficas preliminares.

En las siguientes tablas 8 y 9 se presentan las condiciones optimizadas para la cuantificación de los analitos estudiados.

Tabla 8: Condiciones cromatográficas optimizadas para la separación de CP y CPO.

Temperatura inyección	250 °C
Detector	300 °C
Gas	N ₂
Make Up N₂	20 mL/min
Flujo	1mL/min
Volumen de inyección	3μL
Columna	HP-5: 325°C: 30m x 320μm x 0,25μm

Tabla 9: Programa de temperatura.

Puntos	Razón °C/min	Temperatura °C	Tiempo min	Tiempo total min
Inicial	---	100	1	1
Rampa 1	85	150	0	1,5
Rampa 2	25	200	0	3,6
Rampa 3	7	280	0	15

La selección de estas condiciones fue realizada en base al cálculo del parámetro de resolución R_s obtenido a partir de los resultados cromatográficos, este parámetro constituye una medida cuantitativa de la capacidad para separar dos analitos, tomando en cuenta el ensanchamiento de los picos, cuya magnitud permite asegurar la separación de dos peaks adyacentes (Skoog y col., 2008).

$$R_s = \frac{2 \times [tr(a) - tr(b)]}{W_a + W_b}$$

Donde:

tr_a : tiempo de retención de CP.

tr_b : tiempo de retención de CPO.

W_a : ancho del peak CP.

W_b : ancho del peak de CPO.

El valor encontrado para R_s en las condiciones cromatográficas optimizadas fue de 3,8 lo que indica que los peaks se encuentran bien resueltos (valor mayor a 1,5). En la figura 14 se puede observar el cromatograma con el cual se realizó la determinación de R_s .

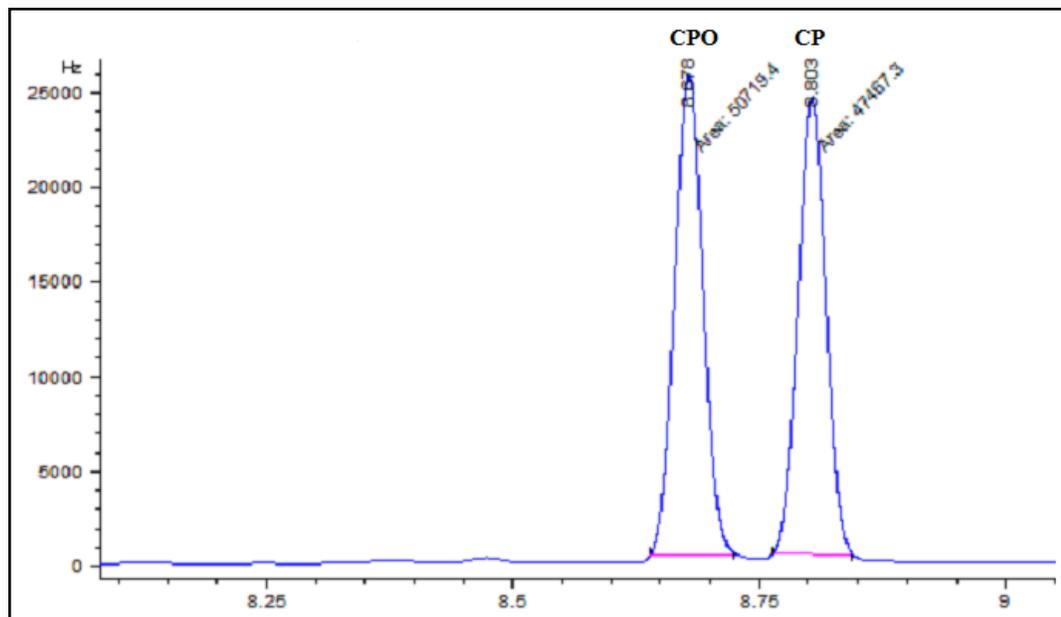


Figura 14: Cromatograma utilizado para cálculo de R_s :

Para disminuir el error por inyección se seleccionó como estándar interno (SI) PCB 101, ya que en las condiciones cromatográficas optimizadas no interfirió en los tiempos de retención de CP y CPO (Tabla 10 y Figura 15).

Tabla 10: Tiempos de retención de los analitos en estudio, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas.

Analito	Tiempo de retención
	min
CPO	8,6
CP	8,8
PCB 101	10,1

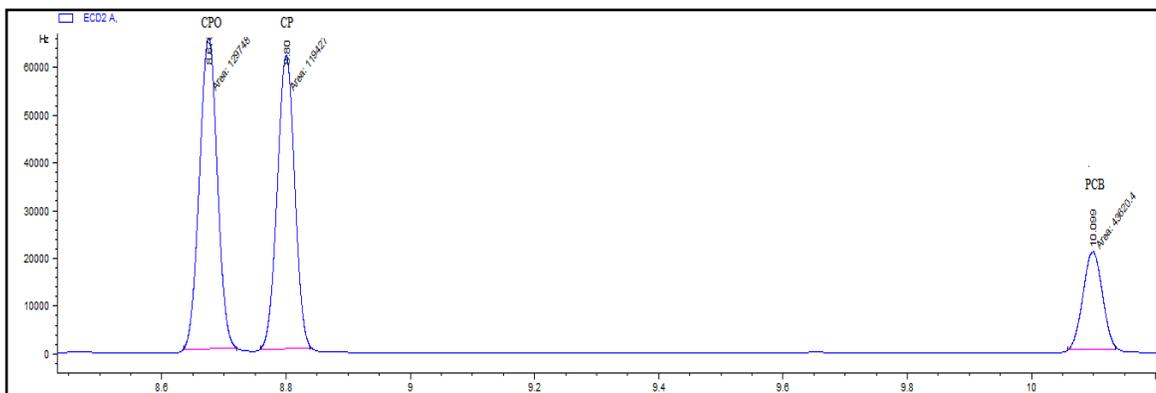


Figura 15: Cromatograma de CP y CPO en las condiciones cromatográficas optimizadas (CPO, CP y PCB están en una concentración de 1236, 219 y 103µg/L respectivamente).

4.4.2. Determinación de los parámetros analíticos de la técnica.

Para la determinación de los parámetros analíticos se utilizaron las soluciones de trabajo (Tabla 4) correspondientes a la curva de calibración, las cuales incluyen al PCB 101 como SI en una concentración cercana a 100µg/L. Cada muestra se inyectó 3 veces, para así obtener un promedio de áreas. En las tablas 11 y 12 se presentan las áreas relativas (promedio) y las concentraciones relativas (promedio) para cada solución; en las figuras

16 y 17 se presentan las curvas de calibración con las respectivas ecuaciones y coeficiente de correlación para cada analito.

Tabla 11: Relación de concentraciones y de área de las soluciones de CP usadas en la curva de calibración.

N°	C _{CP} / C _{PCB}	Área _{CP} / Área _{PCB}
1	3,482	3,867
2	2,772	2,989
3	1,796	1,902
4	0,9990	0,9479
5	0,7528	0,6814
6	0,2476	0,1821
7	0,1004	0,06855
8	0,05071	0,03550
9	0,02086	0,01818

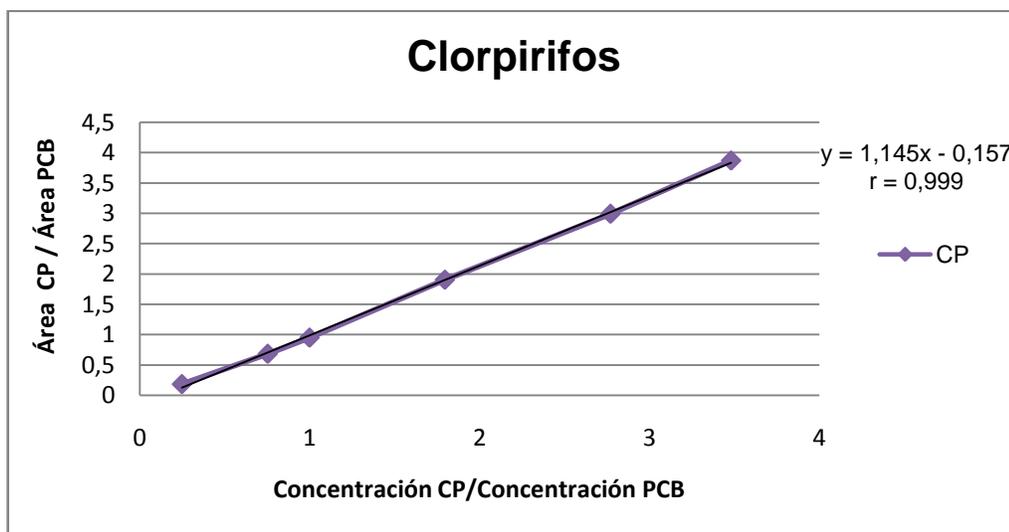


Figura 16: Curva de calibración de clorpirifos

En el caso de clorpirifos oxon se usaron seis soluciones cuyas concentraciones fueron entre 300-80 µg/L. Los resultados se presentan en la tabla 12 y figura 17, en general ambos analitos presentan una buena correlación, con valores de r mayores a 0,995.

Tabla 12: Relación de concentraciones y de área de las soluciones de CPO usadas en la curva de calibración.

Nº	C_{CPO} / C_{PCB}	$\text{Área}_{CPO} / \text{Área}_{PCB}$
1	3,163	0,1277
2	2,598	0,08732
3	1,793	0,05434
4	1,380	0,03705
5	0,9845	0,01802
6	0,7323	0,01019

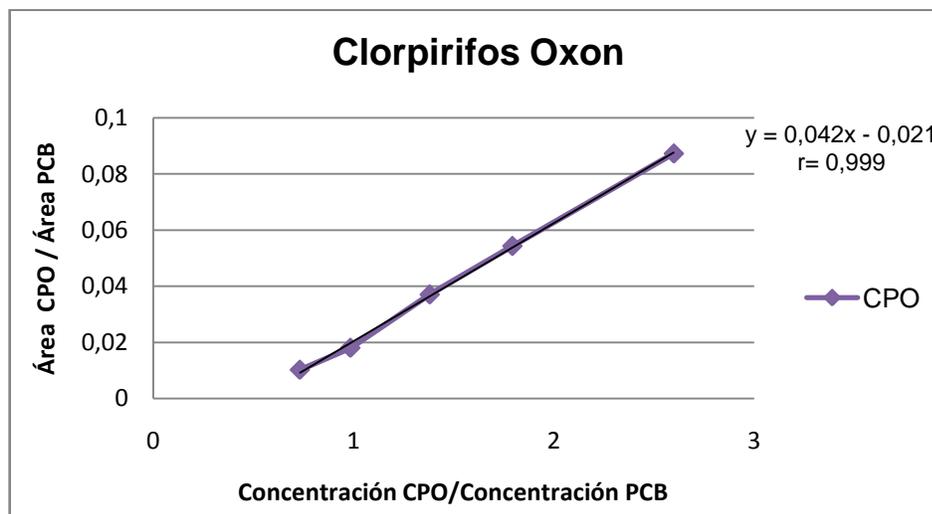


Figura 17: Curva de calibración de clorpirifos oxon.

4.4.3. Cálculo de límite de detección y cuantificación

El cálculo de límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realizó por medio de la inyección de diez blancos (solo n-hexano) según IUPAC (Tabla 13). Para el LD se usó la fórmula $Y_{LD} = Y_B + 3 \sigma_B$, donde σ es la desviación estándar y Y_B es el promedio de los blancos. Para el cálculo de LC se hace el mismo procedimiento pero se multiplica por diez la desviación estándar ($Y_{LC} = Y_B + 10 \sigma_B$). Posteriormente estos valores (Y_{LD} y

Y_{LC}) se interpolaron en la curva de calibración de cada analito, obteniéndose los valores en unidades de concentración para LD y LC (Tabla 14).

Tabla 13: Resultados cromatográficos de la inyección de los blancos.

N°	Área CPO	Área CP	Área PCB	Área CPO / Área PCB	Área CP / Área PCB
1	68,40	176,5	211,0	0,3242	0,8365
2	160,7	201,1	187,8	0,8557	1,071
3	149,8	200,6	166,6	0,8992	1,204
4	118,7	212,4	149,9	0,7919	1,417
5	63,20	182,8	116,8	0,5411	1,565
6	132,2	198,9	166,8	0,7926	1,192
7	115,7	150,9	137,2	0,8433	1,100
8	111,4	230,1	128,6	0,8663	1,789
9	148,8	216,5	189,4	0,7856	1,143
10	161,9	247,9	163,2	0,9920	1,519
Promedio de áreas				0,8	1,3
Desviación estándar				0,2	0,3

Tabla 14: Resultados del LD y LC de CP y CPO mediante el método descrito por la IUPAC, usando GC- μ ECD.

	CP	CPO
C_{LD} ($\mu\text{g/L}$)	2,00	32,7
C_{LC} ($\mu\text{g/L}$)	3,73	65,1

Los límites de detección y cuantificación obtenidos para CP son menores a los valores reportados en la literatura (Tabla 15), ya que al trabajar con un detector de micro captura electrónica el equipo posee una mayor sensibilidad. El método de obtención de LD y LC usado por Lazic y col. (2012) y Marsin y col. (2011) es por medio de la ecuación $LD = \frac{3\sigma}{S}$ y $LC = \frac{10\sigma}{S}$, donde S es la pendiente y σ es la desviación estándar. Estas ecuaciones representan los límites del método y entregan valores más bajos que los calculados por IUPAC, por tanto se podrían decir que entrega datos sobrevalorados. Esto

se puede observar en la tabla 16, donde se calculó LD y LC de este estudio usando los límites del método para clorpirifos y clorpirifos oxon. Para CPO no existen valores de LD y LC publicados hasta el momento.

Tabla 15: Valores reportados de LD y LC del método para CP usando GC-ECD.

Parámetro	¹ Lazic y col. (2012)	² Marsin y col. (2011)
C _{LD} (µg/L)	4	95
C _{LC} (µg/L)	10	318

Tabla 16: LD y LC de CP, CPO del método usando GC-µECD.

Parámetro	CP	CPO
C _{LD} (µg/L)	0,74	14
C _{LC} (µg/L)	2,47	46,3

Por lo tanto al comparar los LC con el mismo método de obtención (tablas 15 y 16), para CP se puede apreciar que se obtuvo un valor 4 veces más bajo con un detector de micro captura.

La diferencia entre los límites calculados para ambos analitos se ve reflejada en las áreas que presentan a una misma concentración, en la figura 18 podemos observar un cromatograma tipo donde se observan los peaks correspondientes de cada analito y del estándar interno, siendo la área de CP 65 veces mayor que CPO a una concentración aproximada de 100 µg/L.

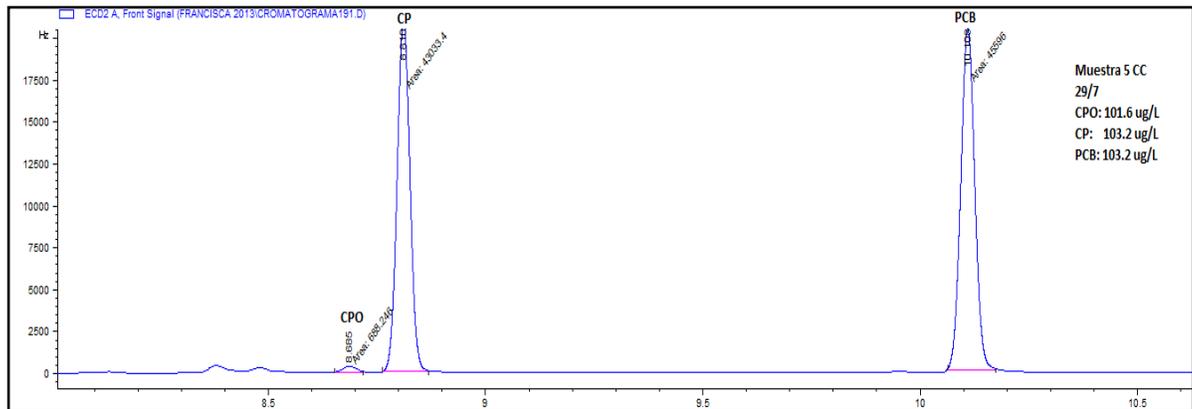


Figura 18: Cromatograma obtenido para una mezcla CPO, CPO y SI a una concentración 100 $\mu\text{g/L}$ aproximadamente. La baja sensibilidad que presenta CPO comparado con la que presenta CP puede ser atribuida por la diferencia estructural que este presenta, ya que CPO tiene un grupo más electronegativo (grupo fosfato), es por tal motivo que se decidió trabajar con un volumen de inyección de 3 μL (Pelit y col., 2012).

4.4.4. Precisión del método

La precisión en este estudio fue evaluada por medio de la replicabilidad y la repetibilidad. La replicabilidad (Tabla 17) se determinó por medio de la inyección del extracto obtenido previa SPE de una muestra acuosa con presencia de MOD fortificada con CP y CPO cuya concentración inicial fue de alrededor 100 $\mu\text{g/L}$. Este análisis fue realizado en triplicado en un mismo día por el mismo operador y en el mismo laboratorio.

Tabla 17: Replicabilidad de CP y CPO

N° Inyección	Á _{CPO} /Á _{PCB}	Á _{CP} /Á _{PCB}
1	0,0419	4,31
2	0,0427	4,32
3	0,0418	4,22
Promedio áreas	0,0421	4,28
Desviación estándar	0,0005	0,06
CV %	1,14	1,30

La repetibilidad (Tabla 18) se calculó por las inyecciones de 3 muestras en matriz cuya concentración de los analitos era de alrededor 100µg/L en diferentes días. A todas estas muestras se les hizo el proceso de extracción en fase sólida y posteriormente se cuantificaron mediante GC-µECD en distintos días.

Tabla 18: Repetibilidad de CP y CPO.

Muestra	Área _{CPO} /Área _{PCB}	Área _{CP} /Área _{PCB}
Día 1	0,04	4,3
Día 2	0,04	4,4
Día 3	0,02	4,2
Promedio áreas	0,03	4,3
Desviación estándar	0,01	0,1
CV %	28,4	2,33

Ambos valores de precisión se expresan por medio del cálculo del coeficiente de variación porcentual (CV%). Al observar los valores de CV% de la tabla 17 podemos asumir que tiene una alta replicabilidad para ambos analitos, no así para los valores de repetibilidad ya que en este caso para CPO se obtuvo un valor de 28,4%, en contraste con el valor que CP presentó, indicando una alta repetibilidad.

4.5. Extracción de analitos desde matriz acuosa.

4.5.1. SPE con cartuchos.

Para la extracción en fase sólida (SPE) se emplearon las soluciones estándar descritas en la tabla 4, las muestras fueron preparadas con agua destilada. Se usó una concentración de 20 µg/L (en 10 mL de solución), ya que este es el máximo valor permitido según EPA (2000, citado en Hamilton 2003), para posteriormente reconstituir en 2 mL de n-hexano en presencia del SI, donde el factor de concentración (FC) fue de 5 llegando a una concentración finalmente de 100µg/L. Como lo muestra la figura 19.



Figura 19: Preparación de solución inicial para SPE en cartuchos

El porcentaje de recuperación (%R) en este caso se calculó de la siguiente manera:

$$\% R = \frac{C (\text{obtenida de analito}) \times 100}{C (\text{esperada})}$$

donde:

$C_{\text{obtenida de analito}}$: concentración que corresponde al valor extrapolado en la curva de calibración.

C_{esperada} : concentración esperada que en este caso es 100µg/L.

En la siguiente tabla 19 se observa el promedio de las áreas obtenidas de 2 muestras (en agua destilada), con el respectivo valor de concentración relativa y el % R para cada marca de cartuchos (UCT, Waters-SEP PACK y Waters-Oasis HLB), además en la y figura 20 se observan las diferencias porcentuales expresadas en un gráfico.

Tabla 19: Porcentaje de recuperación (%R) de SPE usando distintas marcas de cartuchos.

Tipo de Cartucho	UCT		WATERS-SEP PACK		WATERS –OASIS HLB	
	Á CPO /Á PCB	Á CP / Á PCB	Á CPO /Á PCB	Á CP / Á PCB	Á CPO /Á PCB	Á CP / Á PCB
Promedio Áreas	0,03377	0,009235	0,0273	0,1839	0,0185	0,1499
CV %	4,52	16,2	59,1	25,8	31,0	24,4
C Analito / C PCB	1,336	0,1450	1,150	0,2978	0,9411	0,2680
% R	136	14,8	117	30,4	96,1	27,4

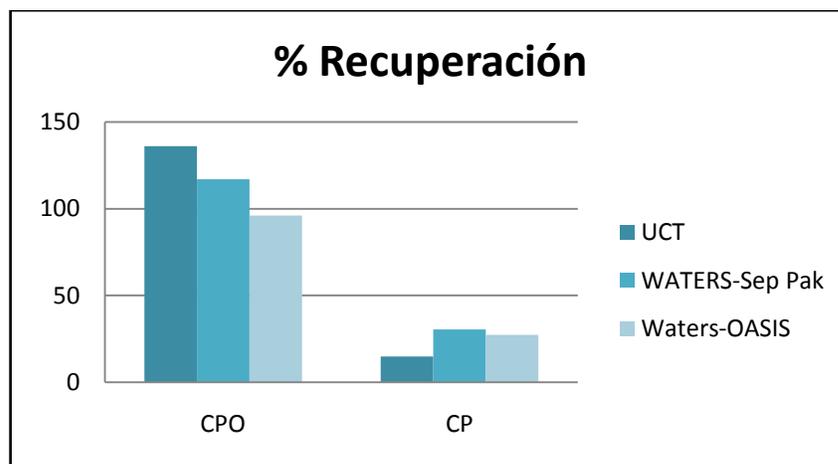


Figura 20: Porcentaje de recuperación para distintas marcas de cartuchos.

Con los tres tipos de cartuchos se obtienen una precisión insuficiente expresada con los valores de CV%, por lo tanto esta técnica no sería la óptima para hacer el proceso de extracción. El cartucho que arrojó valores más elevados de %R fue el Waters- Sep Pak, este cartucho utiliza un sorbente C-18 de fase inversa enlazada a una base de sílice

fuertemente hidrofóbica, reportándose en la bibliografía que es ideal para ser usado en analitos hidrofóbicos de soluciones acuosas (McDonald, 2001). En el caso de los cartuchos Waters-Oasis HLB el sorbente está compuesto por dos monómeros (Figura 21) uno con características hidrofílicas y otro con características lipofílicas, siendo adecuado para la extracción de analitos polares y una retención relativa para analitos hidrofóbicos. La comparación entre ambos tipos de cartuchos es factible ya que presentaron % CV similares, aunque bastante elevados.

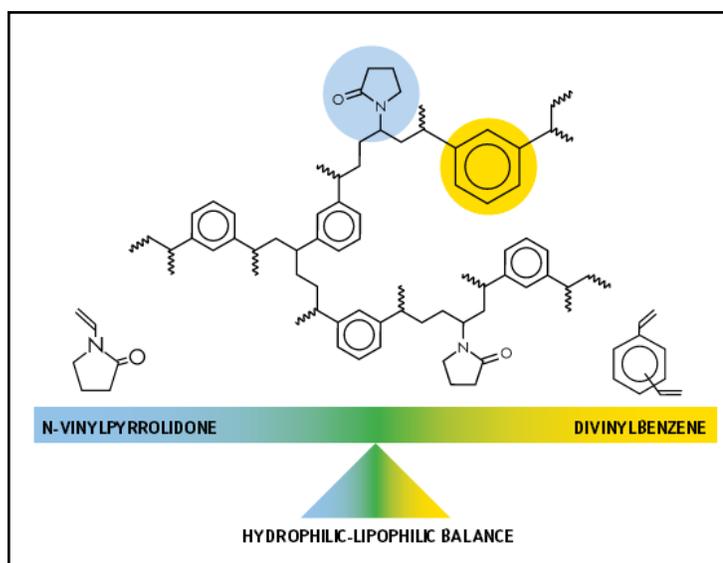


Figura 21: Estructura de cartuchos Waters-Oasis HLB.

4.5.2. SPE con discos.

Se procedió de manera similar que en el punto 4.5.1., pero en esta modalidad se uso discos C-18 (Supelco) donde la concentración inicial para ambos analitos fue de 4µg/L. Como lo muestra la siguiente figura:

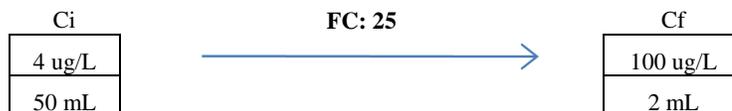


Figura 22: Preparación de solución inicial para SPE en discos

Con estas condiciones de concentración se modificó el tiempo y la temperatura de secado. A continuación se presentan los resultados.

Tabla 20: Porcentaje de recuperación (%R) de SPE en discos usando distintas condiciones de secado.

Variables	1h a T=30°C		1 hora a T ambiente		40 min a T ambiente	
Analito	Á _{CPO} / Á _{PCB}	Á _{CP} / Á _{PCB}	Á _{CPO} / Á _{PCB}	Á _{CP} / Á _{PCB}	Á _{CPO} / Á _{PCB}	Á _{CP} / Á _{PCB}
Promedio áreas	0,02928	0,08872	0,03037	0,4361	0,02391	0,05674
CV %	2,01	5,00	8,27	0,34	1,94	1,67
C_{analito}/C_{PCB}	1,197	0,2146	1,223	0,5180	1,069	0,1867
% R	122	21,9	125	52,9	109	19,1

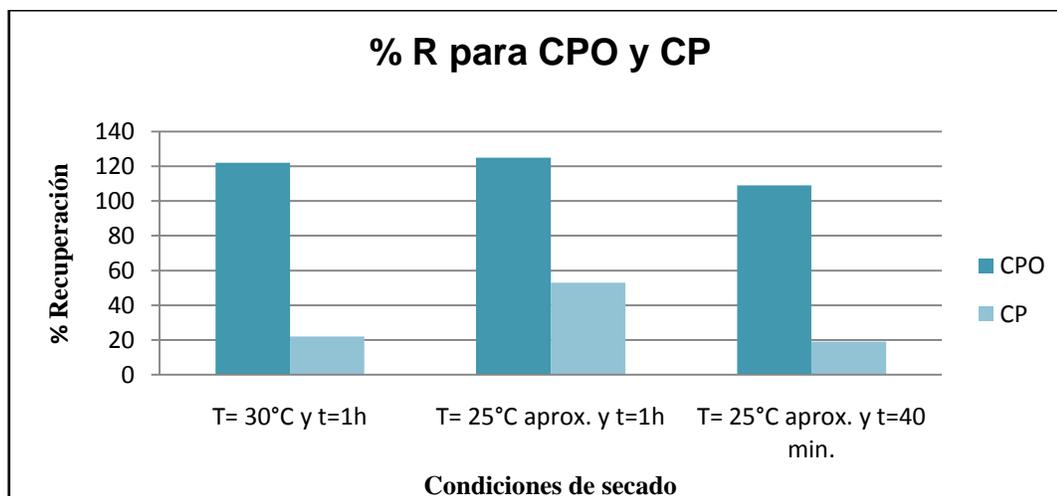


Figura 23: Porcentaje de recuperación (R%) en discos para CP y CPO.

De acuerdo a los datos entregados por la figura 23, podemos observar que la temperatura en conjunto con el tiempo de secado son variables determinantes en el % R, obteniéndose el valor más alto (52,9%) para CP a la temperatura ambiente y el tiempo de 1 hora, esto se debe a que si el disco no está seco en su totalidad puede ser causante de una humectación ineficiente con el solvente de elución y por lo tanto puede provocar un exceso de agua en la muestra a eluir (Catalogo de instrucción discos C-18, Supelco), a partir de estas últimas condiciones se trabajó para optimizar el proceso de extracción.

En virtud de los resultados antes mencionados, se decidió hacer la extracción de manera independiente para cada analito con el fin de poder determinar posibles efectos negativos que tuvieran estos entre si, además la concentración inicial de los analitos (Figura 24) se cambió a 100µg/L, manteniendo el volumen inicial, ya que el LD de CPO es 65 µg/L.

Por último se decidió secar los discos en una estufa al vacío, a una temperatura de 30°C, durante 1 hora, para evitar una posible contaminación. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.



Figura 24: Preparación de solución inicial para SPE en cartuchos, condiciones de secada de 1 hora y 30°C

Tabla 21: Porcentaje de recuperación en función de la temperatura y tiempo de secado de muestras independientes de CP y CPO.

Condición	Secado al vacío T= 30°C y t= 1h	
	CP	CPO
Analito		
Promedio $\bar{A}_{\text{analito}} / \bar{A}_{\text{PCB}}$	25,2	7,4
Desviación estándar	0,6	0,4
CV %	2,47	5,54
$C_{\text{analito}} / C_{\text{PCB}}$	22,1	133
Concentración analito $\mu\text{g/L}$	2257	13525
% R	82	364

Con respecto a los datos arrojados para CPO se decidió hacer nuevas soluciones stock con el fin de descartar un efecto por descomposición del analito y así obtener mediciones coherentes. Por último se trabajó con las mismas condiciones de secado y de concentración anteriores. Los resultados fueron los siguientes para dos muestras.

Tabla 22: Valores de %R para CP y CPO en discos.

Condiciones	Secado al vacío T= 30°C y t= 1h			
	CPO	CP	CPO	CP
Analito				
Promedio áreas.	0,08686	34,97	0,04239	27,22
CV %	11,8	3,11	3,06	1,00
Concentración $\mu\text{g/L}$	244,2	2917	143,5	2274
% R	12,5	88,0	7,23	81,0

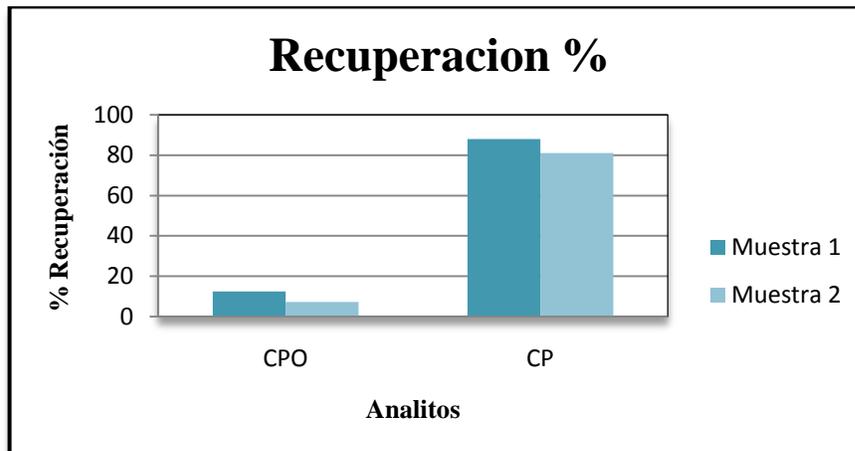


Figura 25: Valores de %R para CP y CPO en discos

A partir de los valores de recuperación podemos concluir que el proceso de optimización de la extracción en fase sólida usando discos con muestras estándares aumentó 2,8 veces el valor de recuperación, ya que para el analito CP, los valores iniciales eran cercanos a 30% y finalmente se obtuvieron valores sobre el 85%. En el caso de CPO los resultados obtenidos en relación a la recuperación demuestran su inestabilidad en el tiempo. Con la nueva preparación de la solución, se obtuvieron valores de recuperación coherente, pero con bajos porcentajes de recuperación, inferiores al 12%. Finalmente, estas últimas condiciones de extracción mediante el uso de discos fueron utilizadas para el análisis de CP y CPO presentes en matriz acuosa con presencia de MOD.

4.6. Interacción CPO-MOD y CP-MOD en matriz acuosa.

4.6.1. Preparación de las mezclas para la interacción

A las muestras de aguas de Laja y Mulchén, se les determinó el contenido de carbono orgánico (CO) por medio de una digestión ácida de las muestras para su posterior

cuantificación mediante UV-VIS. Los resultados de absorbancia (Tabla Anexo 4) fueron interpolados en una curva de calibración (Anexo, Figura A2) realizada con sacarosa en el rango de concentración de 0-1,5 mg/mL, para obtener el valor de carbono orgánico correspondiente a cada muestra de MOD.

Los valores de absorbancia y el respectivo valor de concentración de CO que se obtuvieron para las muestras de Mulchén y Laja se observan en la tabla 23.

Tabla 23: Concentración de C.O. para muestras de MOD de Mulchén y Laja.

Muestra	Absorbancia promedio	CV %	C mg/mL	Alícuota mL	V final mL	Cf mg/mL
Mulchén	0,0730	7,75	54,6	9,1	50	10
Laja	0,123	11,8	132	3,8	50	10

En esta tabla también se pueden observar las alícuotas tomadas para obtener muestras acuosas con una concentración de 10mg/L de carbono orgánico. A estas muestras se les ajustó el pH a alrededor de 6 y se les agregó CP y CPO a una concentración de 100µg/L. Para esta experiencia se hizo un blanco el que contenía CP y CPO en ausencia de MOD. En la tabla 24 se describen las muestras con las respectivas concentraciones iniciales, que se sometieron al proceso de interacción y extracción.

Tabla 24: Concentraciones de CP, CPO y CO de las muestras acuosas.

Muestra	CP µg/L	CPO µg/L	CO mg/mL	pH
Laja	122	97,5	10	5,96
Mulchén	133	98,1	10	6,11
Blanco	129	99,9	no presenta	

4.6.2. Interacción de MOD-CP-CPO.

A continuación se muestran las concentraciones determinadas por la relación de áreas de los extractos obtenidos posteriores a la SPE en discos, extractos que no fueron sometidos al proceso de ultrafiltración en tubos Amicon, además se muestra la concentración teórica de las muestras sometidas al proceso. Los valores de concentración de las muestras que se presentan como valores subrayados, fueron considerados como el 100% del analito sometido a la interacción, y en base a este valor se determinó el grado de interacción del analito en los experimentos con tubos de ultrafiltración Amicon, esta consideración se debe a que no hay disponible material de referencia certificado para clorpirifos y del metabolito oxon en agua.

Tabla 25: Concentraciones de las muestras acuosas sin proceso de ultrafiltración entre MOD-analito.

Muestra	Lugar muestreo	CPO µg/L	CP µg/L	Promedio CPO µg/L	Promedio CP µg/L	C teórica CPO µg/L	C teórica CP µg/L
1LSPE	Laja	145	375	<u>124</u>	<u>370</u>	488	610
2L SPE		102	366				
1M SPE	Mulchen	73,5	250	<u>66.6</u>	<u>242</u>	491	665
2M SPE		59,7	235				
1 SPE	Blanco	134	383	<u>107</u>	<u>369</u>	500	645
2 SPE		80	356				

SPE: Significa que estas muestra no fueron sometidas a ultracentrifugación, sino que fueron directamente sometidas al proceso SPE

El desarrollo de la metodología para el análisis de CP y CPO en matriz acuosa dio cuenta de porcentajes de recuperación de cercanos a 85% para CP, al analizar los resultados de las muestras acuosas que no fueron sometidas al proceso de ultrafiltración

(Tabla 25), se determinó el efecto de la MOD de Mulchén sobre el proceso de extracción de los analitos, donde los porcentajes de recuperación para CPO y CP fueron de 13 y 36 % respectivamente, esto permite evidenciar la interacción de los analitos con la MOD, ya que el complejo CPO-CPO-MOD interviene en el proceso de extracción de los analitos.

Se realizó sólo el análisis de las muestras sometidas a ultrafiltración correspondiente a la fracción que quedo en la zona de arriba de los tubos Amicon (mayor a 3kDa), porque existe una mayor probabilidad de encontrar CP en mayor cantidad. Las áreas se presentan en el Anexo (Tabla Anexo 5). En la tabla 26 se muestran los valores de concentraciones de las muestras analizadas en este proceso.

Tabla 26: Concentraciones de CP y CPO en la fracción mayor a 3kDa, interacción MOD-analito.

Muestra	Lugar muestreo	CPO µg/L	CP µg/L	Promedio CP µg/L	Desviación Estándar CP	CV% CP
1 L	Laja	74,4	14,0	13,9	0,2	1,25
2 L		n.d	13,7			
3 L		n.d	14,0			
1 M	Mulchén	n.d	14,3	14,2	0,2	1,22
2 M		n.d	14,3			
3 M		n.d	14,0			
1	Blanco	66,3	14,2	14,0	0,2	1,09
2		n.d	13,9			
3		n.d	14,0			

n.d: no se detectó señal.

Al comparar las concentraciones de los analitos de la tabla 25 y 26 se observa que al efectuar el proceso de ultrafiltración los niveles disminuyeron drásticamente. Esto se traduce en los porcentajes de recuperación expuestos en la tabla 27.

Tabla 27: Porcentajes de recuperación CPO y CP presente en la fracción mayor a 3 KDa.

Muestra	CPO ug/L	CP ug/L	% R CPO	%R CP	Promedio %R CP
1 L	74,4	14	60,2	3,78	3,75
2 L	n.d	13,7		3,70	
3 L	n.d	14		3,77	
1 M	n.d	14,3		5,90	5,86
2 M	n.d	14,3		5,91	
3 M	n.d	14		5,78	
1	66,3	14,2	62	3,84	3,80
2		13,9		3,75	
3		14		3,80	
CV %		1,42			

n.d: no se detectó señal.

Los resultados obtenidos de la experiencia de interacción de CP con MOD, dan cuenta que los analitos en ausencia de MOD están en un 3,8% en la fracción mayor a 3KDa, y que la MOD proveniente del sector de Laja no interacciona con ellos, a diferencia de la MOD del sector de Mulchén que incrementó en aproximadamente 2 unidades el porcentaje de CP presente en la fracción mayor a 3KDa, donde los resultados obtenidos tienen una buena precisión, con valores menores al 2%. En relación a los resultados de la interacción de CPO con MOD solo se pudo cuantificar los analitos en las muestras de Laja y el blanco, donde la concentración de CPO alcanzó un 60µg/L, siendo el valor determinado cercano al L.C para la metodología, por lo tanto estos valores no tienen confiabilidad analítica.

Sharom y Solomon (2011) evidenciaron que existe cierta relación en la adsorción y desorción del pesticida *permethrin* con el material de plástico de laboratorio,

encontrándose que es bastante difícil la desorción de éste en esta clase de material. Este pesticida tiene características fisicoquímicas similares al clorpirifos, presentando baja solubilidad en agua y gran afinidad a tejidos grasos. Podríamos predecir una posible interacción entre nuestro analito de interés y el material de plástico usado en la ultrafiltración, que puede interferir en la interacción analito-MOD.

Cabe señalar que la interacción se hizo el mismo día que se prepararon las muestras, este factor pudo haber jugado un papel en contra para la detección de los analitos, pero esta decisión se tomo a favor de la inestabilidad del CPO, intentando disminuir su posible degradación.

A partir de los antecedentes se puede deducir que la MOD de Mulchén tiene características distintivas, que permite la interacción con CP. y CPO , esta característica puede ser el tipo de origen de la MOD, que para el caso de Mulchén tiene un origen natural y para el caso de Laja de origen antrópico.

4.7. Afinidad entre clorpirifos y clorpirifos oxon con grupos funcionales.

La diferencia entre los porcentajes de recuperación entre las muestras de Mulchén y Laja (Tabla 27) puede ser atribuida a la diferencia observada en los espectros $^1\text{H-RMN}$. Para Laja se distingue solo la región aromática lo que indica que los compuestos son más simples, por lo tanto, los porcentajes de recuperación son menores en comparación a las muestras de Mulchén. Al comparar los espectros de Mulchén con la bibliografía (Ma y col., 2001), se encontró una concordancia con el espectro de ácido fúlvico que contiene mezclas de compuestos de carácter más complejos, lo que dificultaría la interacción

analito-MOD obteniéndose porcentajes de recuperación mayores en 2 unidades en comparación con las muestras de Laja.

En los espectros IR-TF se pudo observar una mayor abundancia de los grupos -OH para la MOD de Laja, por otro lado los resultados de la interacción dieron que la MOD proveniente de Laja de origen principalmente antrópico no presento afinidad por los analitos CP y CPO, lo cual podría explicarse por la configuración espacial de la MOD al momento de la interacción. Un alto número de grupo funcionales promueve la agregación de la MOD, por su carácter hidrofóbico, impidiendo la interacción de esta con los analitos presentes en el medio. En cambio, una MOD con menor número de grupos funcionales interaccionará con los analitos, lo que concuerda con los resultados de interacción MOD-CP-CPO de Mulchén (Pan, 2008)

5. CONCLUSIONES

- El análisis de la materia orgánica disuelta (MOD) a través de la técnica espectroscópica $^1\text{H-RMN}$ permite obtener la distribución de señales como una huella dactilar, de las muestras de Laja y Mulchén, presentando una concordancia con el espectro de ácido fúlvico y compuestos hidrofílicos, respectivamente.
- El análisis de los espectros de IR-TF de la MOD y sus fracciones según peso molecular permite identificar grupos funcionales, encontrándose para fracciones menores a 1kDa la señal característica $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ la que puede corresponder a la sustitución de anillo aromático en 1:2:3:5 o 1:2:4:5 y para fracciones mayores 1kDa la señal a 2920 cm^{-1} , correspondiente al grupo -OH.
- Es posible cuantificar de manera simultánea a clorpirifos y clorpirifos oxon con un valor de resolución (R_s) de 3,8 por medio del uso de GC- μECD .
- A partir de la optimización de las condiciones cromatográficas, se obtuvieron valores de límite de detección y cuantificación para el analito clorpirifos del orden de $3,73\text{ }\mu\text{g/L}$, mediante GC- μECD , valor menor en 2 unidades de concentración, a los reportados en la bibliografía.
- La técnica de GC- μECD presenta baja sensibilidad para el metabolito clorpirifos oxon con un límite de detección del $32,7\mu\text{g/L}$.
- La replicabilidad del método desarrollado para la cuantificación de ambos analitos es menor al 5% expresado como coeficiente de variación. El análisis de

la repetibilidad arroja valores que indican una buena precisión para CP, menor al 5%, no así para CPO con valores mayor a 20%.

- Se concluye que la SPE en discos permite una extracción más eficiente con respecto al porcentaje de recuperación del clorpirifos en matriz acuosa. Para clorpirifos oxon los porcentajes de recuperación obtenidos fueron del orden del 10%.
- La MOD de origen natural, proveniente de las aguas del rio Bio Bío del sector de Mulchén, presenta un espectro IR-TF con señales de menor intensidad que la MOD de origen antrópico, como es la obtenida de las aguas del rio Bio Bío del sector de Laja, siendo la MOD del sector de Mulchén la que interaccionó con los analitos en matriz acuosa.
- El material de plástico usado en la ultrafiltración actúa como interferente en la determinación de la interacción entre CO-CPO-MOD.

6. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

- ATSDR. 1997. Resumen de salud pública: clorpirifos. [en línea]. <http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs84.pdf>. [consulta: 4 de abril 2013].
- Báez, M, Lastra, O. and Rodríguez, M. 1996. Solid phase extraction of halogenated pesticides from ground and surface Waters and their determination by capillary gas chromatography. *Journal High Resolute Chromatography* 19: 550-563.
- Barra, R. and Carmi, J. 2005. A Simple Method for Extraction and GC-ECD Analysis of Chlorpyrifos from Waters and Environmental Samples. *Journal High Resolute Chromatography* 18: 194-195.
- Bejarano, A. Decho, A. and Chandler, T. 2005. The role of various dissolved organic matter forms on chlorpyrifos bioavailability to the estuarine bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Marine Environmental Research* 60: 111–130.
- Charriau, A. Lesven, L. Gao, Y. Leermakers, M. Baeyens, W. Ouddane and B. Billon, G. 2010. Trace metal behaviour in riverine sediments: role of organic matter and sulfides. *Applied Geochemistry* 26: 80-90.
- Damalas, C and Eleftherohorinos, I. 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8: 1402-1419.

- Echarry, L. 2007. Tema 8: contaminación de aguas. [en línea]. Universidad de Navarra.
<<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:itTornK0KQkJ:www.unav.es/ocw/ecologiaing0708/Tema%25208%2520Contaminacion%2520del%2520agua%252007.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=cl>> [consulta: 24 julio 2014].
- EPA. 2011. Revised chlorpyrifos preliminary registration review drinking Waters assessment. [en línea].
<http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/chlorpyrifos/index.htm> [consulta: 4 abril 2013].
- Errazuriz, A., Castro, C y Cereceda, P. 1993. Medio Ambiente: Una creación de nuestro tiempo. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Esteve, F. 2006. Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. Tesis Doctoral. Valencia, España, Universidad de Valencia, Facultad de Química.
- Garrido, T. 2011. Informe Fondecyt.
- Geisy, J. Solomon, K. Coats, J. Dixon, K. Gidding, J and Kenaga, E. 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. *Environ Contam Toxicol* 160:1-129.
- Hamilton, D. Ambrus, A. Dieterle, R. Felsot, A. Hariss. Holland, P. Katayama, A. Kurihara, N. Linders, J. Unswirth, J. and Wong, S. 2003. Regulatory limits for pesticide residues in Waters. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 75 (8):1123-1155.

- Huang, X. and Lee L. 2001. Effects of Dissolved Organic Matter from Animal Waste Effluent on Chlorpyrifos Sorption by Soils. *Journal Environmental Quality* 30:1258–1265.
- Hur, J. Miranda, A. Williams, M and Schlautamen, A. 2006. Evaluating spectroscopic and chromatographic techniques to resolve dissolved organic matter via and member mixing analysis. *Chemosphere* 63 (3):387-40.
- Junod, J. Zagal, E. Sandoval, M. Barra, R. Vidal, G and Villarroel, M. 2009. Effect of Irrigation Levels on Dissolved Organic Carbon Soil Distribution and the Depth Mobility of Chlorpyrifos. *Chilean journal of agricultural research* 69 (3): 435-444.
- Lazić, S. Šunjka, D and Grahovac, N. 2012. Determination of chlorpyrifos in wáter used for agricultural production. *Agriculture & Forestry* 53 (11): 17-25.
- Ma, H, Allen, H and Yin, Y. 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural Waters and waste Waters effluent, *Wat. Res.* 35 (4): 985-996.
- Manahan, S. 1999. *Environmental Chemistry*. Lewis Publisher. Boca Raton.
- Marsin, M. Umairah, S. Akmam, M. y Ibrahim, W. 2011. Determination of organophosphorus pesticides by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-electron capture detection. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 15 (2):232 – 239.

- Márquez, S. Mosquera, R. Herrera y M. Monedero, C. 2010. Estudio de la absorción y distribución del clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst ex chiov.) cultivadas hidropónicamente. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 23:158-165.
- Mc Donalds, P. and Bouvier, E. 2011. A sample preparation primer and guide to solid phase extraction methods development. A Resource for Sample Preparation Methods Development. Sixth Edition.
- Navarro, G. 2003. *Química Agrícola*. 2ª Ed. Barcelona Grupo Mundi-Prensa.
- Ongley, E. 1996. Control of Waters pollution from agriculture. Food and agriculture organization of United Nations. Rome.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006. Guías para la calidad del agua potable, [en línea].
<http://www.who.int/Waters_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf>. [consulta: 29 marzo 2014].
- Perdeu, E. and Ritchie, J. 2003. Dissolved organic matter in fresh Waters. *Surface and Ground Water, Weathering, and Soils* 5 (10): 273–318.
- Quezada, M. 2011. Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. *Acta Bioethica* 17 (1): 95-104.
- Rodríguez, F. 2003. Procesos de potabilización de agua e influencia del tratamiento de ozonización. Madrid Ediciones Diaz de Santos. 65-66p.

- Santos, P. Otero, M. Filipe, O. Santos, E. and Duarte, A. 2010. Comparison between DAX-8 and C-18 solid phase extraction of rain Waters dissolved organic matter. *Talanta* 83: 505-512.
- Sharom, M. and Solomon, K. 2011. Adsorption and Desorption of Permethrin and Other Pesticides on Glass and Plastic Materials used in Bioassay Procedures. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences Abstract* 38 (2): 199-204.
- Sherene, T. 2010. Mobility and transport of heavy metals in polluted soil environment. *Biological Forum An International Journal* 2(2): 112-121.
- Skoog Douglas, Holler James y Crouch Stanley, *Principios de Análisis Instrumental*, Octava Edición, Cengage Learning, 2008.
- Song, Nin. Liang, C. Hung, Y. 2008. Effect of dissolved on mobility and activation chlortoluron in soil and wheat. *Geoderma* 146:344-352.
- Tadini, A. Campanha, A. Moreira, A y Bisinoti, M. 2013. Copper (II) and Nickel (II) Complexation Capacity of Dissolved Organic Matter from Rivers of Agricultural and Urban Areas in the State of São Paulo. *Journal Brazilian Chemistry Society* 24 (11): 1789-1797.
- Wang, L. Wu, F. Zhang R. Li, Wen and Liao, H. 2008. Characterization of dissolved organic matter fractions from lake Hongfeng, Southwestern China Plateau. *Journal of Environmental Sciences* 21: 581-588.
- Watts, M. 2012. Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. *Oficina de Comunicaciones y Administración Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL)*. Santiago de Chile.

7. ANEXO

Tabla A 1: Productos comerciales con clorpirifos como ingrediente activo, regulados por SAG.



SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO, SAG.

LISTA DE PLAGUICIDAS CON AUTORIZACIÓN VIGENTE

Serie 1000

Fecha de actualización: 24-03-2014

Cantidad 296

Nota: La información contenida en esta Planilla no contiene toda la información relativa al uso de cada plaguicida, para esto se solicita consultar la etiqueta.

NOMBRE COMERCIAL	INGREDIENTE ACTIVO	CONCENTRACION	TIPO FORMULACION	GRUPO QUIMICO	TOXICIDAD
LORSBAN 4E	CLORPIRIFÓS	48 % p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
PYRINEX 48 EC	CLORPIRIFÓS	48 % p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
LORSBAN 50 WP	CLORPIRIFÓS	50% p/p	POLVO MOJABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
LORSBAN 15 G	CLORPIRIFÓS	15% p/p	GRANULADO	ORGANOFOSFATOS	IV (Verde)
CLORPIRIFOS 48 % CE	CLORPIRIFÓS	48% p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
LORSBAN 10 D	CLORPIRIFÓS	15% p/p	POLVO SECO	ORGANOFOSFORADOS	IV (Verde)
CLORPIRIFOS S 480	CLORPIRIFÓS	48% p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
TROYA 4 EC	CLORPIRIFÓS	48% p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
POINTER 15 G	CLORPIRIFÓS	15% p/p	GRANULADO	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
CHLORPIRIFOS 50% WP	CLORPIRIFÓS	50% p/p	POLVO MOJABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
CYREN 48 EC	CLORPIRIFÓS	48% p/v (480 g/l)	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFORADOS	II (Amarillo)
CYREN 15 G	CLORPIRIFÓS	15% p/p	GRANULADO	ORGANOFOSFATOS	IV (Verde)
LORSBAN 75 WG	CLORPIRIFÓS	75% p/p	GRANULADO DISPERSABLE	ORGANOFOSFATOS	III (Azul)
CYREN 50 WP	CLORPIRIFÓS	50% P/P	POLVO MOJABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
PYRINEX 25 CS	CLORPIRIFÓS	25% p/v	SUSPENSION DE ENCAPSULADO	ORGANOFOSFORADOS	III (Azul)
MASTER 25 CS	CLORPIRIFÓS	25% p/v	SUSPENSION DE ENCAPSULADO	ORGANOFOSFATOS	III (Azul)
TROYA 50 WP	CLORPIRIFÓS	50% p/p	POLVO MOJABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
MASTER 48% EC	CLORPIRIFÓS	48% p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)
CLORPIRIFOS 48 EC	CLORPIRIFÓS	48 % p/v	CONCENTRADO EMULSIONABLE	ORGANOFOSFATOS	II (Amarillo)

Fuente: <http://www.sag.cl/content/lista-de-plaguicidas-autorizados/>

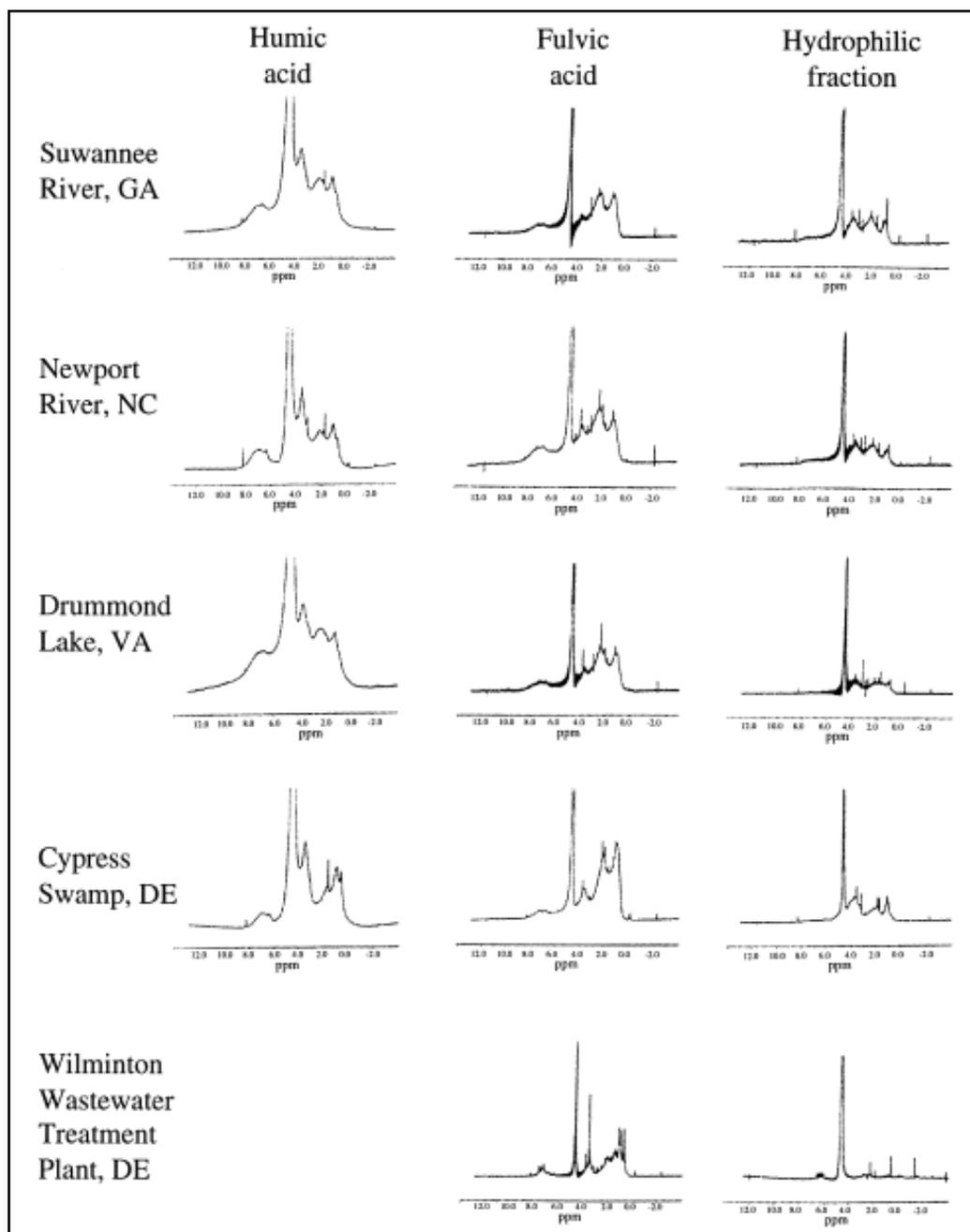


Figura A 1: Espectros ^1H -RMN para la MOD, publicados por Huizhong y col., 2001.

Tabla A 2: Condiciones del programa base del equipo

Temperatura inyección	280°C
Detector	300°C
Gas	N ₂
Make Up N₂	20mL/min
Flujo	2,3 mL/min
Volumen de inyección	2µL
Columna	HP-5: 325°C: 30m x 320µm x 0,25µm

Tabla A 3: Programa de temperatura del programa base del equipo

Puntos	Razón °C/min	Temperatura °C	Tiempo min	Tiempo total min
Inicial	---	50	2	2
Rampa 1	75	200	1	5
Rampa 2	30	230	1	7
Rampa 3	15	280	2	12,3

Tabla A 4: Soluciones de sacarosa para la curva de calibración para la determinación de C.O.

Muestra	Concentración	Promedio absorbancia	CV %
	mg/mL		
1	0	0,0260	43,5
1			
2	0,10	0,1080	5,24
2			
3	0,25	0,2075	1,02
3			
4	0,50	0,3710	2,29
4			
5	1,00	0,6840	2,89
5			
6	1,50	1,0230	4,29
6			

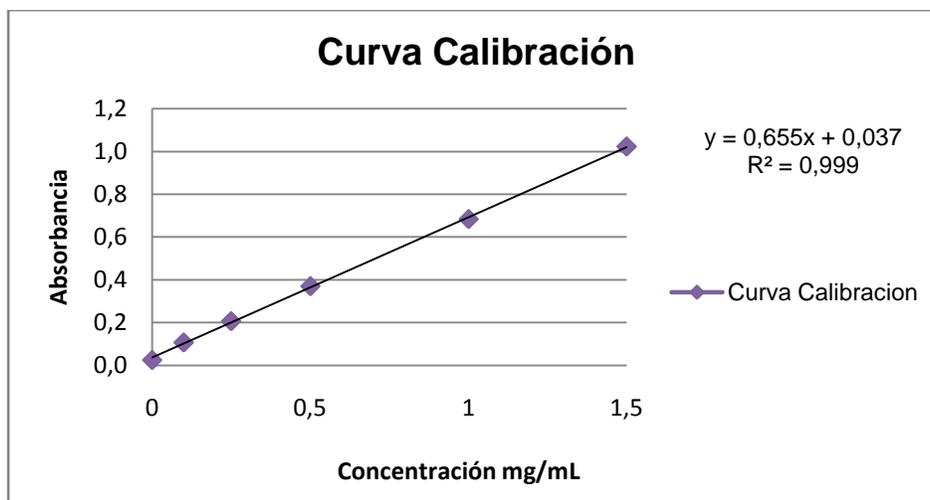


Figura A 2: Curva de calibración de sacarosa para la determinación de C.O..

Tabla A 5: Áreas Relativas de CPO y CP para las muestras sometidas a interacción con MOD.

Muestra	Promedio de área relativa CPO	Promedio de área relativa CP
1L	0,01135	0,008995
2L	n.d	0,005429
3L	n.d	0,008653
1LSPE	0,04212	4,282
2L SPE	0,02334	4,183
1M	n.d	0,01254
2M	n.d	0,01273
3M	n.d	0,009116
1M SPE	0,01096	2,804
2M SPE	0,004960	2,629
1	0,007820	0,01110
2	n.d	0,006280
3	n.d	0,009286
1 SPE	0,03713	4,383
2 SPE	0,01379	4,062

L: Muestra de Laja.

M: Muestra de Mulchén.

SPE: Significa que estas muestras no fueron sometidas al proceso de ultracentrifugación sino que fueron directamente sometidas al proceso de SPE.

n.d: no se detectó señal.